



**Sara Sofia de Jesus Aguiar**

Licenciada em Bioquímica

## **Controlo da alergenicidade do soro de leite por reticulação com transglutaminase**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Franco, Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova  
de Lisboa

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Luísa Fernando,  
Faculdade de Ciências e Tecnologia da  
Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) [Nome Completo]

Arguente: Prof. Doutora Maria Alice dos Santos Pereira

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

**Outubro 2017**

**LOMBADA**



**Controlo da alergenidade do soro de leite por reticulação com transglutaminase**  
**Sara Aguiar**

**2017**



**Sara Sofia de Jesus Aguiar**

Licenciada em Bioquímica

## **Controlo da alergenicidade do soro de leite por reticulação com transglutaminase**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Franco, Faculdade de  
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova  
de Lisboa

Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Luísa Fernando, Faculdade  
de Ciências e Tecnologia da Universidade  
Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor(a) [Nome Completo]

Arguente: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Alice dos Santos Pereira

Vogal: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



# **Controlo da alergenicidade do soro de leite por reticulação com transglutaminase**

COPYRIGHT© em nome de Sara Aguiar,  
da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, e da  
Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios



## **Agradecimentos**

Queria agradecer e dizer um grande obrigado aos meus pais, Lucília e Adelino, ao meu irmão, Pedro, pelo amor, carinho, paciência e apoio incondicional durante todo este percurso e principalmente nas horas de desespero. A eles, à minha tia Mercês, e àqueles que já não podem festejar comigo esta vitória, tia Lurdes, avó Idalina e avô Fortunato, dedico este trabalho.

Agradeço ainda aos meus primos e irmãos de coração, Cláudia, Susana, Marco, Filipe e Sandra, que sempre estiveram ao meu lado em todas as loucuras, momentos bons e menos bons, que tivemos que ultrapassar durante este percurso, e que nunca me deixaram desistir.

Um grande obrigado ao Marcelo por ser a pessoa fantástica e carinhosa que tanto me ajudou nesta fase da minha vida sem nunca perder a paciência.

Não posso deixar de agradecer à minha grande amiga Patrícia que vivenciou comigo todas as batalhas da minha vida académica e que foi sempre uma presença positiva e a minha família durante este tempo longe de casa.

Um agradecimento especial e um grande obrigado à Maria Inês com quem trabalhei durante todo este ano, que viveu comigo as dores da investigação científica e que se revelou uma grande amiga.

Um muito obrigado ao Professor Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares, Professor Auxiliar com Agregação da UNL/FCT, à Professora Doutora Ana Luísa Almaça da Cruz Fernando, Professora Auxiliar da UNL/FCT pela orientação do presente trabalho de dissertação, pela constante partilha de conhecimento, disponibilidade, paciência e apoio prestado durante a realização desta dissertação. Sem o vosso apoio, seria impossível alcançar o objetivo proposto.

A todos os meus colegas, alunos e investigadores, dos laboratórios onde trabalhei, que sempre estiveram presentes nos melhores e piores momentos, pela amizade, companheirismo, apoio e diversão.

A todas as minhas amigas um grande obrigado por fazerem parte da minha vida e estarem presentes em todos os momentos.





**Partes do presente trabalho foram já publicadas:**

Fernando AL, **Aguiar SS**, Veloso MI, Franco R (2017) Control of Milk Allergenicity, Journal of Dairy & Veterinary Sciences, 2 (5), 1-6.

**Aguiar SS**, Veloso MI, Fernando AL, Franco R (2017) Controlo da capacidade alergénica do soro de leite por reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina. In: Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (ed) Livro de Resumos do 4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura, do Nutriente à Embalagem – Inovação e Desafios, SPASS 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 21 Setembro 2017, 63-64.

Veloso MI, **Aguiar SS**, Franco R, Fernando AL (2017) Avaliação da estabilidade do soro de leite após reticulação da beta-lactoglobulina. In: Sanches-Silva A, Vilarinho F, Santos M, Andrade M (ed) Livro de Resumos do 4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura, do Nutriente à Embalagem – Inovação e Desafios, SPASS 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 21 Setembro 2017, 52-53.

**Partes do seguinte trabalho foram apresentadas publicamente sob a forma de poster:**

**Aguiar SS**, Veloso MI, Fernando AL, Franco R (2017) Controlo da capacidade alergénica do soro de leite por reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina. 4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura, do Nutriente à Embalagem – Inovação e Desafios, SPASS 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 21 Setembro 2017.(P1-16)

Veloso MI, **Aguiar SS**, Franco R, Fernando AL (2017) Avaliação da estabilidade do soro de leite após reticulação da beta-lactoglobulina. 4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura, do Nutriente à Embalagem – Inovação e Desafios, SPASS 2017, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal, 21 Setembro 2017 P1-11



## Resumo

As alergias alimentares estão classificadas entre os maiores problemas de saúde humana pela OMS.

O soro de leite apresenta uma mistura de proteínas, contendo todos os aminoácidos essenciais sendo a  $\beta$ -lactoglobulina a proteína alergénica dominante.

Devido à elevada taxa de consumo do soro de leite é fundamental encontrar uma metodologia que reduza o potencial alergénico das proteínas do soro sem as remover. A reticulação de proteínas pela transglutaminase é uma técnica recente que permite obter um produto final não alergénico com um conteúdo de proteína equivalente ao produto original.

Neste estudo procurou-se otimizar as condições de aplicação desta técnica à  $\beta$ -lactoglobulina, ao soro comercial e ao soro de queijo, em termos de pré-tratamentos (essenciais ao funcionamento da enzima), da quantidade mínima de enzima a utilizar e do tempo mínimo necessário para a reação enzimática recorrendo às técnicas de FTIR, de eletroforese em SDS-PAGE e à metodologia de Kuchroo e Fox.

Concluiu-se que a melhor condição de pré-tratamento, é o aquecimento da amostra a 80°C seguido de acerto de pH 7. Para que a reação de reticulação das proteínas seja mais eficiente, no caso da  $\beta$ -lactoglobulina, é necessária a adição de 1,1 mg de TG (25U)/mL de solução (5mg de proteína) e 90 a 180 minutos de reação. No soro comercial, são necessários 75mg de TG (100 U)/mL de soro (76mg de proteína) e 10 horas para se atingir a fase estacionária da reticulação. O soro de queijo necessita da adição de 17,2mg de TG (100U)/mL de soro (1,72mg de proteína) e de 6 horas de reação para obter os melhores resultados de reação. Quando se adicionaram os potenciadores, iões de cálcio (80mg/100mL) e de zinco (157mg/100mL), e os inibidores, iões cobre (134mg/100mL) e de ferro (144mg/100mL), da TG ao soro de queijo nas condições otimizadas, verificou-se que os iões de cálcio e zinco também inibem a atividade da TG, contrariamente ao esperado, resultando numa diminuição da eficiência da reação de reticulação. O ião cobre é o que inibe mais a ação da TG reduzindo o seu rendimento em 13%, segundo a técnica de FTIR, ou em 30%, segundo o método da determinação do azoto solúvel em água.

Palavras-chave: soro de leite, reticulação,  $\beta$ -lactoglobulina, transglutaminase, potencial alérgico.



## Abstract

Food allergies are considered one of the most important human health problems by the WHO. Whey is a mixture of proteins, containing all the essential amino acids where  $\beta$ -lactoglobulin is the dominant allergenic protein.

Owing to the high consumption of whey it is thus essential to find a methodology that reduces the allergenic potential of whey proteins without removing them. Protein crosslinking by transglutaminase is a recent technique that allows the obtention of a non-allergenic end-product with a protein content that is equivalent to the original product.

The aim of this study was to optimize and to study the conditions of application of the transglutaminase cross-linking technique to the  $\beta$ -lactoglobulin, to commercial whey and to cheese whey, in terms of pre-treatments (essential to the functioning of the enzyme), minimum amounts of enzyme to be used and minimum time required for enzymatic reaction. Techniques used were FTIR, SDS-PAGE and the Kuchroo and Fox methodology.

It was concluded that the best pre-treatment condition is by heating the sample at 80°C followed by setting at pH 7. For the protein-crosslinking reaction to be more efficient, in the case of  $\beta$ -lactoglobulin, it is necessary to add 1.1 mg of TG (25U)/mL of solution (5mg of protein) and 90 to 180 minutes of reaction. In the case of commercial whey, it was found that 75mg of TG (100 U)/mL of serum (76mg of protein) and 10 hours were necessary to reach the stationary phase of the crosslinking reaction. Conversely, cheese whey needs the addition of 17.2 mg of TG (100U)/mL of whey (1.72mg of protein) and 6 hours of reaction to obtain the best reaction results. When activators of TG were added, calcium sulfate (80mg/100mL) and zinc sulfate (157mg/100mL), and inhibitors of TG, copper sulfate (134mg/100mL) and iron sulfate (144mg/100mL) were added to the cheese whey in optimized crosslinking condition, it was found that calcium and zinc ions also inhibit TG activity, contrary to what was expected, resulting in a decrease in the efficiency of the crosslinking reaction. The copper ion shows the highest inhibition of TG activity, by reducing its yield by 13% when analyzed by FTIR or 30% when analyzed by WSN.

Keywords: whey, cross-linking,  $\beta$ -lactoglobulin, transglutaminase, allergic potential.



## Índice

Agradecimentos .....	VII
Resumo.....	XI
Abstract.....	XIII
Abreviaturas .....	XXXVII
Capítulo I. Introdução.....	1
1. Leite .....	1
1.1. Importância do leite na alimentação humana .....	1
1.2. A alergenidade do leite .....	2
1.3. Principais constituintes do leite .....	3
1.3.1. Caseínas .....	6
1.3.1.1. $\alpha_1$ -Caseína .....	6
1.3.1.2. $\alpha_2$ -Caseína .....	7
1.3.1.3. $\beta$ -Caseína .....	7
1.3.1.4. $\kappa$ -Caseína .....	7
1.3.1.5. $\gamma$ -Caseína .....	7
2. Soro de leite – <i>Whey</i> .....	7
2.1. Proteínas do soro de leite .....	8
2.1.1. $\beta$ -Lactoglobulina .....	9
2.1.2. $\alpha$ -Lactoalbumina .....	10
2.1.3. Outros constituintes proteicos .....	11
2.1.3.1. Imunoglobulinas (Ig) .....	11
2.1.3.2. Glicomacropéptido (GMP).....	12
2.1.3.3. Albumina de Soro Bovino (BSA) .....	12
2.1.3.4. Lactoferrina.....	12
2.1.3.5. Lactoperoxidase .....	13
2.1.3.6. Lisozima.....	13
2.1.3.7. Transferrina .....	13
2.2. Aplicações do soro de leite na indústria alimentar .....	13
3. Tratamentos aplicados ao soro de leite para uma diminuição da alergenidade	14
3.1. Aplicação de micro-ondas .....	14

3.2.	Aplicação de Ultrassons .....	14
3.2.1.	Banho de Ultrassons .....	15
3.2.2.	Sonda de Ultrassons .....	15
3.3.	Tratamento térmico .....	15
3.4.	Tratamento a alta pressão .....	16
3.5.	Reação de Maillard e glicação .....	17
3.6.	Fermentação ácido-láctica .....	18
3.7.	Digestão de proteínas .....	18
3.7.1.	Digestão química .....	18
3.7.2.	Digestão enzimática ou Hidrólise enzimática .....	19
3.8.	Reticulação Enzimática .....	20
3.8.1.	Transglutaminase .....	20
3.8.1.1.	Pré-tratamentos .....	22
3.8.1.2.	Inibidores e Potenciadores da Transglutaminase .....	22
4.	Aplicações da Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier à análise da estrutura secundária de proteínas .....	23
5.	Proteólise de soro de origem láctea .....	27
5.1.	Azoto amoniacal (NH <sub>3</sub> ) .....	28
5.2.	Azoto solúvel em água (WSN) .....	28
5.3.	Azoto solúvel em ácido fosfotúngstico (PTASN) .....	28
5.4.	Azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCASN) .....	28
6.	Objetivos .....	28
Capítulo II.	Métodos Experimentais .....	31
1.	Preparação da $\beta$ -lactoglobulina .....	31
1.1.	Adição de transglutaminase à solução de $\beta$ -lactoglobulina .....	31
1.2.	Estudos cinéticos de reticulação pela transglutaminase .....	32
2.	Preparação do soro comercial .....	32
2.1.	Adição de transglutaminase ao soro comercial .....	33
2.2.	Estudos cinéticos de reticulação pela transglutaminase .....	33
3.	Preparação do Soro de Queijo .....	34
3.1.	Estudos cinéticos de reticulação pela transglutaminase .....	34



3.2.	Inibidores e potenciadores da transglutaminase.....	34
4.	Estrutura secundária das proteínas do soro determinada por FTIR.....	35
5.	Análise por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ...	36
5.1.	Preparação das amostras .....	36
6.	Determinação da concentração de proteínas no soro .....	37
6.1.	Azoto total.....	37
6.2.	Avaliação da proteólise .....	38
6.2.1.	Azoto amoniacal (NH <sub>3</sub> ) .....	38
6.2.2.	Azoto solúvel em água (WSN) .....	39
6.2.3.	Azoto solúvel em ácido fosfotúngstico (PTASN).....	39
6.2.4.	Azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCASN) .....	40
Capítulo III.	Resultados e Discussão .....	41
1.	β-lactoglobulina .....	41
1.1.	Estudo das diferentes condições de pré-tratamento.....	42
1.1.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	42
1.1.1.1.	Região de Amida I .....	44
1.1.1.1.1.	Efeito do aquecimento nas condições de pré-tratamento.....	47
1.1.1.1.2.	Efeito do pH nas condições de pré-tratamento.....	49
1.1.1.2.	Região de Amida A e B .....	50
1.1.2.	Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE .....	51
1.2.	Otimização da concentração de transglutaminase para reticulação nas melhores condições de pré-tratamento .....	53
1.2.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	54
1.2.1.1.	Região de Amida I .....	55
1.2.1.1.1.	Condição de pré-tratamento: com aquecimento seguido do acerto de pH	55
1.2.1.1.2.	Condição de pré-tratamento: com acerto de pH seguido de aquecimento	58
1.2.1.2.	Região de Amida A e B .....	61
1.2.1.3.	Comparação das duas condições em estudo .....	62
1.2.2.	Análise segundo a eletroforese em géis de poliacrilamida: SDS-PAGE .....	63
1.2.2.1.	SDS-PAGE na presença de β-Mercaptoetanol.....	64

1.2.2.2.	SDS-PAGE na ausência de $\beta$ -Mercaptoetanol .....	65
1.3.	Estudo da cinética com transglutaminase em condições otimizadas de concentração e de enzima.....	66
1.3.1.	Condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de $\beta$ -lactoglobulina .....	66
1.3.1.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	66
1.3.1.2.	Análise segundo a eletroforese em géis de poliacrilamida: SDS-PAGE ....	68
1.3.2.	Condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 25U de TG/g de $\beta$ -lactoglobulina .....	70
1.3.2.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	70
1.3.2.2.	Análise segundo a eletroforese em géis de poliacrilamida: SDS-PAGE ....	73
2.	Soro comercial.....	74
2.1.	Otimização das condições de pré-tratamento.....	75
2.1.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	75
2.1.1.1.	Efeito do aquecimento nas condições de pré-tratamento.....	78
2.1.1.2.	Efeito do pH nas condições de pré-tratamento .....	79
2.1.1.3.	Estudo da desnaturação da amostra de soro comercial nas diferentes condições de pré-tratamento .....	80
2.1.2.	Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE .....	82
2.1.3.	Análise do efeito das frações azotadas na proteólise .....	84
2.2.	Estudo da adição de 50U de transglutaminase/g de proteína nas diferentes condições de pré-tratamento .....	86
2.2.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	87
2.2.2.	Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE .....	91
2.3.	Estudo da cinética de reticulação com transglutaminase em condições de pré-tratamento otimizada .....	95
2.3.1.	Cinética da condição com acerto de pH seguido de aquecimento com 50U de transglutaminase/g de proteína, 24h .....	95
2.3.1.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	96

2.3.1.2.	Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE ....	99
2.3.2.	Cinética da condição com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de transglutaminase/g de proteína, 10h .....	101
2.3.2.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	101
2.3.2.2.	Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE ....	103
3.	Soro de Queijo.....	105
3.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	106
3.2.	Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE.....	108
3.3.	Análise do efeito das frações azotadas na proteólise .....	109
3.4.	Análise do soro de queijo em condições otimizadas: com aquecimento seguido do acerto de pH com 100U de transglutaminase/g de proteína, 10h .....	111
3.4.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	111
3.4.2.	Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE .....	114
3.4.2.1.	Com adição de $\beta$ -Mercaptoetanol .....	114
3.4.2.2.	Sem adição de $\beta$ -Mercaptoetanol .....	115
3.5.	Estudo da adição de potenciadores e inibidores de transglutaminase na melhor condição de pré-tratamento de soro de queijo.....	116
3.5.1.	Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier	116
3.5.1.1.	Potenciadores da Transglutaminase.....	117
3.5.1.2.	Inibidores da Transglutaminase .....	118
3.5.1.3.	Comparação entre o soro de queijo fortificado com potenciadores ou com inibidores da Transglutaminase.....	119
3.5.2.	Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE .....	120
3.5.2.1.	Com adição de $\beta$ -Mercaptoetanol .....	121
3.5.2.2.	Sem adição de $\beta$ -Mercaptoetanol .....	122
3.5.3.	Análise do efeito das frações azotadas na proteólise .....	123
	Conclusão .....	125
	Perspetivas Futuras .....	129
	Bibliografia .....	131

Anexos .....	135
1. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier: FTIR.....	135
1.1. Espectrómetros de FTIR .....	135
1.2. Técnicas de Medições.....	137
1.3. Cálculo da banda de amida I.....	138
2. Eletroforese em Géis de Poliacrilamida .....	139
3. Materiais e Métodos .....	140
3.1. Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....	140
3.2. Proteólise.....	142
4. Resultados e Discussão .....	143
4.1. $\beta$ -lactoglobulina .....	143
4.1.1. Estudo das diferentes condições de pré-tratamento.....	143
4.1.1.1. Espectro de FTIR: Região de Amida I .....	143
4.1.1.2. Espectro de FTIR: Região de Amida A e B.....	145
4.1.2. Otimização da concentração de transglutaminase para reticulação nas melhores condições de pré-tratamento .....	147
4.1.2.1. Espectro de FTIR: Região de Amida I .....	147
4.1.2.1.1. Condição de pré-tratamento: com aquecimento seguido do acerto de pH	147
4.1.2.1.2. Condição de pré-tratamento: com acerto de pH seguido de aquecimento	148
4.1.2.2. Espectro de FTIR: Região de Amida A e B.....	150
4.1.2.2.1. Condição de pré-tratamento: com aquecimento seguido do acerto de pH	150
4.1.2.2.2. Condição de pré-tratamento: com acerto de pH seguido de aquecimento	152
4.1.3. Estudo da cinética com transglutaminase em condições otimizadas de concentração e de enzima.....	154
4.1.3.1. Condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de $\beta$ -lactoglobulina .....	154
4.1.3.2. Condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 25U de TG/g de $\beta$ -lactoglobulina .....	155
4.2. Soro comercial.....	156

4.2.1.	Otimização das condições de pré-tratamento.....	156
4.2.1.1.	Espetro de FTIR: Região de Amida I .....	156
4.2.1.2.	Espetro de FTIR: Região de Amida A e B.....	158
4.2.2.	Estudo da adição de 50U de transglutaminase/g de proteína nas diferentes condições de pré-tratamento .....	160
4.2.2.1.	Espetro de FTIR: Região de Amida I .....	160
4.2.3.	Estudo da cinética de reticulação com transglutaminase em condições de pré-tratamento otimizada .....	162
4.2.3.1.	Cinética da condição com acerto de pH seguido de aquecimento com 50U de transglutaminase/g de proteína, 24h .....	162
4.2.3.2.	Cinética da condição com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de transglutaminase/g de proteína, 10h .....	164
4.3.	Soro de queijo .....	165
4.3.1.	Espetro de FTIR: Região de Amida I .....	165
4.3.2.	Espetro de FTIR: Região de Amida A e B.....	165
4.3.3.	Estudo da cinética de reticulação com transglutaminase em condições de pré-tratamento otimizada: com aquecimento seguido do acerto de pH com 100U de transglutaminase/g de proteína, 10h .....	167
4.3.4.1.	Potenciadores da transglutaminase .....	168
4.3.4.2.	Inibidores da transglutaminase .....	168



## Índice de Figuras

<b>Figura I.1:</b> Estrutura dos dois maiores alergénicos do soro de leite.....	3
<b>Figura I.2:</b> Estrutura terciária da $\beta$ -lactoglobulina de bovino .....	9
<b>Figura I.3:</b> Estrutura terciária da proteína $\alpha$ -lactoalbumina.....	11
<b>Figura I.4:</b> Estrutura terciária da enzima transglutaminase .....	21
<b>Figura I.5:</b> Mecanismos das reações catalisadas pela transglutaminase.....	21
<b>Figura I.6:</b> Espectro ilustrativo de FTIR aplicado a proteínas.....	25
<b>Figura I.7:</b> Diagrama com a atribuição das posições das bandas de Amida I para cada estrutura secundária, em D <sub>2</sub> O.....	26
<b>Figura III.1:</b> Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, das amostras de $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas cinco condições de pré-tratamento.....	43
<b>Figura III.2:</b> Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, das amostras de $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas cinco condições de pré-tratamento.....	43
<b>Figura III.3:</b> Diagrama com a atribuição das posições das bandas de Amida I para cada estrutura secundária, em D <sub>2</sub> O.....	45
<b>Figura III.4:</b> Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluido, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , da amostra de $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas cinco condições de pré-tratamento.....	46
<b>Figura III.5:</b> Somatório das percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas diferentes condições de pré-tratamento. ....	47
<b>Figura III.6:</b> Gel de poliacrilamida a 12% com três condições de pré-tratamento da $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 30 mg/mL. ....	52
<b>Figura III.7:</b> Gel de poliacrilamida a 12% com duas condições de pré-tratamento da $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 30 mg/mL. ....	52
<b>Figura III.8:</b> Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, da amostra de $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH (iv). ....	55
<b>Figura III.9:</b> Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluido, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , da amostra de $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH (iv). ....	56
<b>Figura III.10:</b> Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com diferentes quantidades de TG.....	57
<b>Figura III.11:</b> Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, da amostra de $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento (v). ....	58

**Figura III.12:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento (v)..... 59

**Figura III.13:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com diferentes quantidades de TG..... 60

**Figura III.14:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com diferentes quantidades de TG..... 62

**Figura III.15:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com diferentes quantidades de TG..... 63

**Figura III.16:** Gel de poliacrilamida a 12% com duas condições de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me. .... 64

**Figura III.17:** Gel de poliacrilamida a 12% com duas condições de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me. .... 65

**Figura III.18:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 67

**Figura III.19:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH ..... 68

**Figura III.20:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com a  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me..... 69

**Figura III.21:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com a  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me..... 69



**Figura III.22:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 25U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 71

**Figura III.23:** Gráfico com a absorvância a  $1635\text{cm}^{-1}$  ( $n^\circ$  de onda) em função do tempo, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 25U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 71

**Figura III.24:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 25U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 72

**Figura III.25:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com 25U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com a  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me..... 73

**Figura III.26:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com 25U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com a  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me..... 73

**Figura III.27:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, das amostras de soro comercial a 9% nas cinco condições de pré-tratamento..... 76

**Figura III.28:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro comercial em  $\text{D}_2\text{O}$  a 9% nas cinco condições de pré-tratamento. .... 78

**Figura III.29:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial em  $\text{D}_2\text{O}$  a 9%, nas diferentes condições de pré-tratamento, na região de amida I..... 80

**Figura III.30:** Gel de poliacrilamida a 12%. Soro comercial a 10%, diluído para 30mg/mL, em diferentes condições de pré-tratamento..... 82

**Figura III.31:** Gel de poliacrilamida a 12%. Soro comercial a 10%, diluído para 30mg/mL, em diferentes condições de pré-tratamento..... 83

**Figura III.32:** Valores médios e desvio padrão correspondentes para o azoto amoniacal, azoto solúvel em PTA 5%, azoto solúvel em TCA 12% e azoto solúvel em água, obtidos nas amostras de soro comercial nas diferentes condições de pré-tratamento em estudo. .... 85

**Figura III.33:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína nas cinco condições de pré-tratamento..... 88

**Figura III.34:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial em D<sub>2</sub>O a 9%, sem e com 50U de TG/g de proteína nas cinco condições de pré-tratamento, na região de amida I.

..... 90

**Figura III.35:** Gel de poliacrilamida a 12% com as 5 condições de pré-tratamento do soro comercial a 1%, diluído para 30 mg/mL, e de  $\beta$ -lactoglobulina a 5%, diluída para 30 mg/mL ... 92

**Figura III.36:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento. .... 96

**Figura III.37:** Gráfico com a absorvância a  $1646\text{cm}^{-1}$  ( $n^{\circ}$  de onda) em função do tempo, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 25U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 97

**Figura III.38:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, na janela de  $1700$  a  $1600\text{cm}^{-1}$ . .... 98

**Figura III.39:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro comercial com 50U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, com o soro comercial a 10% diluído para 30 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me..... 99

**Figura III.40:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro comercial com 50U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, com o soro comercial a 10% diluído para 30 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me..... 100

**Figura III.41:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação de soro comercial a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com aquecimento seguido de acerto de pH..... 101

**Figura III.42:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro comercial a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, na janela de  $1700$  a  $1600\text{cm}^{-1}$ . .... 102

**Figura III.43:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro comercial com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com o soro comercial a 10% diluído para 30 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me..... 103

<b>Figura III.44:</b> Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro comercial com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com o soro comercial a 10% diluído para 30 mg/mL sem adição de $\beta$ -Me.....	104
<b>Figura III.45:</b> Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de Amida I, janela 1700 a 1600 $\text{cm}^{-1}$ , desconvolvido, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , da amostra de soro de queijo em $\text{D}_2\text{O}$ na condição de pré-tratamento sem aquecimento sem acerto de pH (i).....	106
<b>Figura III.46:</b> Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução do espectro obtido pela espectroscopia de FTIR, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias da amostra de soro de queijo simples em $\text{D}_2\text{O}$ , (i) sem aquecimento sem acerto de pH, na região de amida I. ....	107
<b>Figura III.47:</b> Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução do espectro da espectroscopia de FTIR, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias da amostra de soro de queijo simples em $\text{D}_2\text{O}$ , (i) sem aquecimento sem acerto de pH, na região de amida I. ....	108
<b>Figura III.48:</b> Gel de poliacrilamida a 12%. Soro de queijo, diluído para 30mg/mL, na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. ....	109
<b>Figura III.49:</b> Valores médios e desvio padrão correspondentes para o azoto amoniacal, azoto solúvel em PTA 5%, azoto solúvel em TCA 12% e azoto solúvel em água, obtidos na amostra de soro de queijo simples em estudo.....	111
<b>Figura III.50:</b> Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. ....	112
<b>Figura III.51:</b> Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, na região de amida I. ....	113
<b>Figura III.52:</b> Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro de queijo com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, com o soro de queijo a 10% diluído para 30 mg/mL com adição de $\beta$ -Me.....	114
<b>Figura III.53:</b> Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro de queijo com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, com o soro de queijo diluído para 30 mg/mL sem adição de $\beta$ -Me. ....	115
<b>Figura III.54:</b> Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvolvido, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , relativos ao estudo da amostra de	

soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH com a adição de potenciadores e inibidores..... 116

**Figura III.55:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH..... 117

**Figura III.56:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH..... 118

**Figura III.57:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH relativas ao estudo da adição de inibidores e potenciadores da TG, na região de amida I. .... 119

**Figura III.58:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à adição de potenciadores e inibidores da TG ao soro de leite com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, com o soro de queijo a 10% diluído para 30 mg/mL, com adição de  $\beta$ -Me..... 121

**Figura III.59:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à adição de potenciadores e inibidores da TG ao soro de leite com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, com o soro de queijo a 10% diluído para 30 mg/mL, sem adição de  $\beta$ -Me..... 122

**Figura III.60:** Valores médios e desvio padrão correspondentes ao azoto solúvel em água (a verde), obtidos das amostras de soro de queijo a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH relativas ao estudo da adição de inibidores e potenciadores da TG..... 124

**Figura 1:** Esquema do espectrómetro de FTIR..... 136

**Figura 2:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas cinco condições de pré-tratamento.. ..... 145

**Figura 3:**Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH (iv). ..... 150

**Figura 4:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento (v). ..... 152

**Figura 5:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro comercial a 9% nas cinco condições de pré-tratamento. .... 158

**Figura 6:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na banda de amida I, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro comercial em D<sub>2</sub>O a 9% com 50U de TG/g de proteína nas cinco condições de pré-tratamento. .... 160

**Figura 7:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na banda de amida A e B, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro de queijo na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. .... 165



## Índice de Tabelas

<b>Tabela I.1:</b> Composição típica do leite em pó industrial.....	1
<b>Tabela I.2:</b> Composição geral do leite de vaca UHT gordo.....	3
<b>Tabela I.3:</b> Composição total do leite de vaca UHT gordo.....	5
<b>Tabela I.4:</b> Composição total do leite de vaca UHT gordo.....	6
<b>Tabela I.5:</b> Principais proteínas do leite de vaca.....	6
<b>Tabela I.6:</b> Atribuição das posições das bandas na região de Amida I para cada estrutura secundária, em D <sub>2</sub> O. ....	26
<b>Tabela III.1:</b> Atribuição das posições das bandas na região de Amida I para cada estrutura secundária, em D <sub>2</sub> O. ....	45
<b>Tabela III.2:</b> Valores médios e desvio padrão correspondentes ao azoto total e quantidade de proteína em solução de soro comercial. ....	85
<b>Tabela III.3:</b> Correspondência entre a condição de pré-tratamento em estudo com 50U de TG/g de proteína, do soro de queijo comercial, e as bandas relevantes que aparecem nos géis de SDS-PAGE.....	92
<b>Tabela III.4:</b> Valores médios e desvio padrão correspondentes ao azoto total e quantidade de proteína em solução do soro de queijo. ....	110
<b>Tabela 0.1:</b> Reagentes e respetiva quantidade para a realização de dois géis de poliacrilamida.....	140
<b>Tabela 0.2:</b> Lista de soluções e respetiva receita utilizadas na eletroforese de poliacrilamida em SDS. ....	141
<b>Tabela 0.3:</b> Lista de soluções utilizadas na metodologia adaptada de Kuchroo e Fox. .	142
<b>Tabela 0.4:</b> Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. ....	143
<b>Tabela 0.5:</b> Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH. ....	143
<b>Tabela 0.6:</b> Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH. ....	143
<b>Tabela 0.7:</b> Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa <i>PeakFit v4.12</i> , correspondentes às estruturas secundárias das amostras de $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. ....	144

**Tabela 0.8:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento. .... 144

**Tabela 0.9:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. .... 145

**Tabela 0.10:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH. .... 146

**Tabela 0.11:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH. .... 146

**Tabela 0.12:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 146

**Tabela 0.13:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento. .... 146

**Tabela 0.14:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 25U de TG/g de proteína. .... 147

**Tabela 0.15:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 50U de TG/g de proteína. .... 147

**Tabela 0.16:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 100U de TG/g de proteína. .... 147

**Tabela 0.17:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 200U de TG/g de proteína. .... 148



**Tabela 0.18:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 25U de TG/g de proteína. .... 148

**Tabela 0.19:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 50U de TG/g de proteína. .... 148

**Tabela 0.20:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 100U de TG/g de proteína. .... 149

**Tabela 0.21:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 200U de TG/g de proteína. .... 149

**Tabela 0.22:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 25U de TG/g de proteína. .... 150

**Tabela 0.23:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 50U de TG/g de proteína. .... 151

**Tabela 0.24:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 100U de TG/g de proteína. .... 151

**Tabela 0.25:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 200U de TG/g de proteína. .... 151

**Tabela 0.26:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 25U de TG/g de proteína. .... 152

**Tabela 0.27:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 50U de TG/g de proteína. .... 152

**Tabela 0.28:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 100U de TG/g de proteína. .... 153

**Tabela 0.29:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 200U de TG/g de proteína. .... 153

**Tabela 0.30:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 154

**Tabela 0.31:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento. .... 155

**Tabela 0.32:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. .... 156

**Tabela 0.33:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH. .... 156

**Tabela 0.34:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH. .... 156

**Tabela 0.35:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 157

**Tabela 0.36:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento. .... 157

**Tabela 0.37:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas

secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. .... 158

**Tabela 0.38:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH. .... 159

**Tabela 0.39:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH. .... 159

**Tabela 0.40:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 159

**Tabela 0.41:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento. .... 159

**Tabela 0.42:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. .... 160

**Tabela 0.43:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH. .... 161

**Tabela 0.44:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH. .... 161

**Tabela 0.45:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 161

**Tabela 0.46:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento. .... 161

**Tabela 0.47:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas

secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento..... 162

**Tabela 0.48:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro comercial a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 164

**Tabela 0.49:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. .... 165

**Tabela 0.50:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas da amostra de soro de queijo na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. .... 166

**Tabela 0.51:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. .... 167

**Tabela 0.52:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH na presença de potenciadores da TG, sulfato de cálcio e sulfato de zinco. .... 168

**Tabela 0.53:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH na presença de inibidores da TG, sulfato de cobre e sulfato de ferro..... 168

## Abreviaturas

**$\alpha$ -La** –  $\alpha$ -lactoalbumina

**$\beta$ -Lg** –  $\beta$ -lactoglobulina

**$\beta$ -Me** –  $\beta$ -mercaptoetanol

**APS** – Persulfato de amónio

**ATR** – Refletância Total Atenuada

**BSA** – Albumina do soro bovino

**CMD** – Carboximetildextrano

**DTT** – Ditioneitol

**ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; Ensaio de Imunoabsorção enzimática

**FTIR** – *Fourier-transform Infrared Spectroscopy*; Espectroscopia de Infravermelhos por

Transformada de Fourier

**GMP** – Glicomacropéptido

**H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>** – Água destilada

**H<sub>2</sub>O<sub>up</sub>** – Água ultrapura

**HIFU** – *High Intensify Focused Ultrasound*; Ultra Sons Focalizados de alta intensidade

**Ig** – Imunoglobulina

**IgA** – Imunoglobulina A

**IgD** – Imunoglobulina D

**IgE** – Imunoglobulina E

**IgG** – Imunoglobulina G

**IgM** – Imunoglobulina M

**IUPAC** – União Internacional de Química Pura e Aplicada

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PAGE** – *Polyacrylamide gel electrophoresis*; Eletroforese em gel de poliacrilamida

**Pb** – Chumbo

**pH** – Potencial de hidrogénio

**pI** – Ponto isoelétrico

**PM** – Peso Molecular

**PTA** – Ácido fosfotúngstico

**PTASN** – Azoto solúvel em ácido fosfotúngstico

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**TCA** – Ácido tricloroacético

**TCASN** – Azoto solúvel em ácido tricloroacético

**TDC** – Acoplamento dipolar de transição

**TEMED** – Tetrametiletenodiamina

**TG** – Transglutaminase

**UHT** – Ultrapasteurização

**WHO** – *World Health Organization*

**WSN** – Azoto solúvel em água



## Capítulo I. Introdução

### 1. Leite

Os maiores produtores de leite, em 2013, foram a União Europeia, os Estados Unidos da América e a Índia, onde a produção global de leite rondou os 466 milhões de toneladas. Nesse mesmo ano, foram produzidas aproximadamente 15,8 milhões de toneladas de proteína de leite, uma vez que, em média, há 3,4% de proteína por tonelada de leite.<sup>1,2</sup>

Apenas 5% do leite de vaca produzido globalmente é usado no comércio internacional de produtos lácteos. O comércio internacional baseia-se principalmente em produtos lácteos manufaturados, como manteiga, queijo e leite em pó, assim como produtos lácteos fluidos, sorvetes, iogurte e uma grande variedade de ingredientes, como produtos de soro de leite, concentrados de proteína do leite, leite em pó e produtos de caseína.<sup>1</sup>

O leite em pó foi o primeiro ingrediente lácteo usado pela indústria alimentar e constitui a maior parte do comércio internacional de produtos lácteos até hoje. É produzido por secagem de leite líquido fresco com inúmeros ajustes e padronizações para atender às necessidades do mercado, representa uma grande variedade de produtos com diferentes níveis de gordura, proteína, solubilidade e outras características (tabela I.1).<sup>1</sup>

**Tabela I.1:** Composição típica do leite em pó industrial.<sup>1</sup>

	<b>Proteínas</b>	<b>Gorduras</b>	<b>Água</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Carboidratos</b>
Leite em pó	24 a 27%	26,8%	3,3%	5,8%	41%
Leite em pó desnatado	33%	0,8%	3,8%	7,9%	56%
Leite em pó sem gordura	34 a 37%	1,0%	3,8%	8,4%	52%

#### 1.1. Importância do leite na alimentação humana

O leite é um fluido biológico caracterizado por conter todos os nutrientes necessários para um mamífero recém-nascido, dependendo, na sua constituição, das necessidades das diferentes espécies.<sup>3</sup> O leite humano é a alimentação mais adequada para os bebés, mas quando este não se adequa às necessidades do recém-nascido ou não se encontra disponível, o leite de vaca é o mais utilizado como substituto do leite humano.<sup>3,4</sup> O leite, na sua forma natural, é único como fonte equilibrada das necessidades nutricionais do ser humano, uma vez que é um alimento altamente nutritivo.<sup>4-7</sup> As várias etapas de processamento e armazenamento do leite têm um impacto mensurável sobre alguns dos seus nutrientes específicos.<sup>2,7</sup>

As proteínas do leite, incluindo as proteínas do soro, para além do seu elevado valor biológico, possuem péptidos bioativos que atuam como agentes antimicrobianos, anti-hipertensivos, reguladores da função imune, assim como fatores de crescimento. O consumo de leite ajuda também na formação dos ossos, estimulando a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, aumentando a densidade óssea e inibindo a reabsorção de cálcio.<sup>4</sup>

Devido ao seu elevado consumo a nível mundial, o leite tem sido fortificado com nutrientes que são essenciais para a saúde humana. Estes alimentos lácteos oferecem um potencial adequado para transmitir ingredientes nutritivos à dieta humana.<sup>2,7</sup> O leite de vaca, assim como os seus derivados, são uma boa fonte de cálcio sendo responsáveis por cerca de 50% do total de cálcio ingerido.<sup>2,4,8,9</sup>

## 1.2. A alergenidade do leite

As alergias a alimentos são, segundo a organização mundial de saúde (OMS), o sexto maior problema a nível mundial.<sup>10</sup> A difusão crescente de alergias alimentares nos países desenvolvidos tornou-se um problema sério ao nível da saúde humana.<sup>3,10</sup>

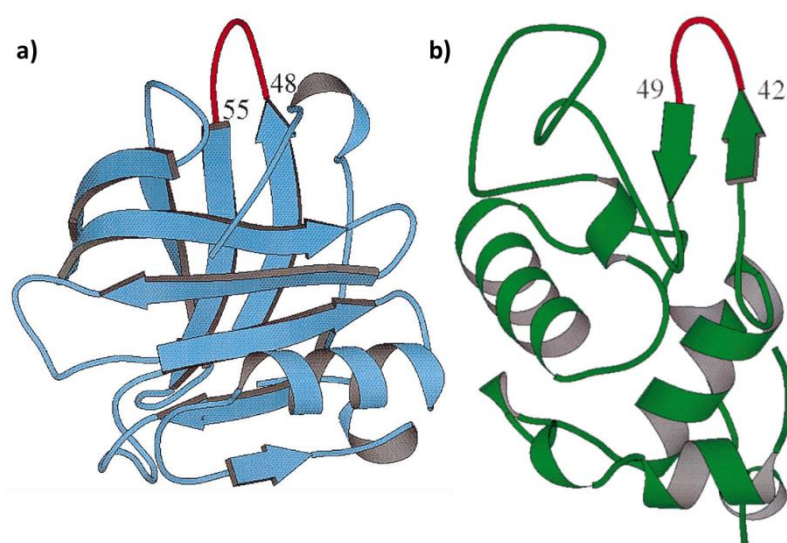
A alergenidade de certos alimentos, ou ingredientes alimentares, afeta tanto crianças como adultos. Em 2015 estimava-se que cerca de 2 a 10% da população mundial era afetada por algum tipo de alergia alimentar.<sup>10</sup> A alergia a alimentos reflete-se num nível elevado de anticorpos, imunoglobulina E (IgE), dirigidos contra um antígeno alimentar ingerido. As alergias alimentares mais comuns são ao leite de vaca, aos ovos, ao peixe, aos crustáceos e marisco, aos amendoins, às nozes, à soja e ao trigo.<sup>3,6,10,11</sup>

A alergia ao leite de vaca, uma das alergias alimentares mais comuns, corresponde a uma reação imunológica contra os antígenos do leite<sup>3,6,10</sup>, sendo causada maioritariamente por fragmentos de proteínas que contêm epítomos que, não sendo hidrolisados pelas enzimas digestivas, conseguem atravessar a barreira intestinal e desencadear uma resposta alérgica.<sup>3,12</sup>

A alergia ao leite de vaca é mais comum na infância afetando, em 2015, cerca de 2 a 6% da população infantil a nível mundial e mais de 1% da população adulta. Este tipo de alergias pode surgir logo nos recém-nascidos, durante os primeiros seis meses de vida, sendo desencadeadas pelo tipo de alimentação da mãe. As diferenças entre os constituintes do leite de vaca e do leite materno é uma das razões que induz o aparecimento de alergias em crianças. A alergia do leite em recém-nascidos pode ser superada a partir do primeiro ano de vida, contudo 15% das crianças afetadas permanecem alérgicas.<sup>3,5,6,10,12,13</sup>

No leite de vaca, existem mais de 100 proteínas, cada uma das quais pode, teoricamente, causar hipersensibilidade, conhecida como alergia à proteína do leite de vaca.<sup>3,6,14</sup> As principais proteínas responsáveis por esta alergia no leite são a  $\alpha_{S1}$ -caseína, a  $\alpha_{S2}$ -caseína, a  $\beta$ -caseína, a k-caseína, e as proteínas do soro de leite, entre elas a  $\beta$ -lactoglobulina (figura I.1 (a)), a  $\alpha$ -lactoalbumina (figura I.1 (b)) e as imunoglobulinas (Ig).<sup>3,6,10,11,15</sup> A albumina de soro bovino (BSA) assim como a lactoferrina, são uma pequena parte das proteínas vestigiais que se encontram no leite de vaca e podem desencadear uma reação alérgica.<sup>3,6</sup>





**Figura I.1:** Estrutura dos dois maiores alergénicos do soro de leite, retirado de Sharma.<sup>15</sup> **a)**  $\beta$ -lactoglobulina com ansa alergénica (Pro 48 – Glu 55) indicada a vermelho. **b)**  $\alpha$ -lactoalbumina com ansa alergénica (Val 42 – Glu 49) indicada a vermelho.

A  $\beta$ -lactoglobulina é o alergénico dominante no leite. Este alergénico foi reconhecido pelo IgE em mais de 90% dos pacientes que apresentam alergia ao leite. Não existindo tratamentos profiláticos, o foco da pesquisa consiste em encontrar ligandos capazes de se ligar à  $\beta$ -lactoglobulina, diminuindo a sua alergenicidade.<sup>3,5,10–12,15,16</sup> No caso específico do leite de vaca, a proteína foi reconhecida como alergénica em aproximadamente 50% dos pacientes alérgicos a este tipo de leite.<sup>12,16</sup>

### 1.3. Princípios constituintes do leite

A composição e a qualidade do leite determinam o seu valor nutricional. No entanto, a qualidade biológica do leite depende da sua constituição em componentes bioativos, que devido às suas propriedades possuem um efeito positivo na saúde humana.<sup>14</sup>

O leite de vaca é constituído, maioritariamente, por água, hidratos de carbono, lípidos e proteínas, tabela I.2.

**Tabela I.2:** Composição geral do leite de vaca UHT gordo, segundo o Serviço Nacional de Saúde (2017).<sup>17</sup>

Componentes	Quantidade em percentagem (%)
Água	88,1
Hidratos de Carbono	4,7
Lípidos	3,5
Proteínas	3
Outros constituintes	0,7

As substâncias biologicamente ativas que se encontram presentes no leite de vaca abrangem proteínas, péptidos, aminoácidos, açúcares, vitaminas, enzimas, esteroides, fosfolípidos e ácidos gordos (tabela I.3 e I.4).<sup>14</sup> Nestes componentes existem vários que merecem uma atenção especial, como a lactoferrina, a lisozima, a imunoglobulina secretora (IgA), a  $\beta$ -lactoglobulina, a albumina de soro bovino (BSA), a vitamina B12, a  $\beta$ -caseína, a  $\kappa$ -caseína e os sais biliares uma vez que inibem o crescimento de células cancerígenas.<sup>14</sup>

O leite é uma fonte importante de minerais e nutrientes (tabela I.3 e I.4) na dieta humana onde cerca de 40% a 74% do cálcio ingerido pela população mundial é derivado de produtos lácteos.<sup>2,9</sup> O cálcio, juntamente com o magnésio, o potássio e o sódio, têm um papel importante na estrutura e estabilidade das micelas de caseína.<sup>2,8,18</sup> O ferro, outro dos componentes minerais do leite, encontra-se numa proporção que pode variar de 0,01% a 0,09%.<sup>19,20</sup> Para os produtos lácteos serem considerados uma fonte de ferro, é necessário a adição deste mineral como suplemento alimentar, que pode variar entre 0,8mg a 3mg por 100mL de leite, consoante o tipo de fabricante.<sup>19,20</sup>

**Tabela I.3:** Composição total do leite de vaca UHT gordo, segundo o Serviço Nacional de Saúde (2017).<sup>17</sup>

Compostos	Quantidade	Unidades
<b>Macronutrientes</b>		
Lípidos	3,5	g
Ácidos gordos saturados	2,0	g
Ácidos gordos monoinsaturados	0,8	g
Ácidos gordos polinsaturados	0,1	g
Ácido linoleico	0,1	g
Ácidos gordos trans	0,1	g
Hidratos de carbono	4,7	g
Total de hidratos de carbono expresso em monossacáridos	4,9	g
Mono e dissacáridos	4,7	g
Oligossacáridos	0	g
Amido	0	g
Sal	0,1	g
Fibra Alimentar	0	g
Álcool	0	g
Água	801	g
Ácidos orgânicos	0	g
Colesterol	13	mg
<b>Vitaminas</b>		
Vitamina A total (equivalentes de retinol)	59	µg
Caroteno	29	µg
Vitamina D	0,1	µg
a-tocoferol	0,07	mg
Tiamina	0,04	mg
Riboflavina	0,14	mg
Niacina	0,2	mg
Equivalentes de niacina	0,9	mg
Triptofano/60	0,7	mg
Vitamina B6	0,04	mg
Vitamina B12	0,18	µg
Vitamina C	0	mg
Folatos	1	µg

**Tabela I.4** Composição total do leite de vaca UHT gordo, segundo o Serviço Nacional de Saúde (2017)<sup>17</sup>, continuação da tabela I.3.

Compostos	Quantidade	Unidades
<b>Minerais</b>		
Cinza	0,75	g
Sódio (Na)	43	mg
Potássio (K)	160	mg
Cálcio (Ca)	110	mg
Fósforo (P)	77	mg
Magnésio (Mg)	9	mg
Ferro (Fe)	0,1	mg
Zinco (Zn)	0,4	mg

Contudo, o que atribui ao leite o seu elevado valor nutricional são as suas proteínas (tabela I.5). Estas são uma mistura heterogénea de proteínas do soro de leite, que representam 0,6% a 3% da composição total do leite e 15 a 20% das proteínas totais do leite, e de caseínas.<sup>14,21</sup>

**Tabela I.5:** Principais proteínas do leite de vaca segundo Micinski.<sup>14</sup>

Proteínas	Quantidade presente no leite de vaca (g/L)
Caseínas	28
$\beta$ -lactoglobulina	6,30
$\alpha$ -lactoalbumina	3,2
Lactoferrina	0,10
Lactoperoxidase	0,03
Lisozima	0,0004
Glicomacropéptidos	1,20

### 1.3.1. Caseínas

As caseínas são as proteínas mais abundantes do leite de vaca representando 2,6% a 2,8% da constituição total do leite assim como 79% das proteínas totais do leite. Podem distinguir-se cinco isóformas de caseína, que diferem entre si na sua concentração, no conteúdo em fósforo, na composição de aminoácidos, no peso molecular e no ponto isoelétrico das proteínas constituintes.<sup>14,22,23</sup>

#### 1.3.1.1. $\alpha_1$ -Caseína

A  $\alpha_1$ -caseína, que possui um peso molecular de 23kDa, é uma fosfoproteína que se encontra presente no leite de vaca numa gama de 12 a 15g/dm<sup>3</sup>. Uma das maiores causas para esta proteína ser um potencial alergénio em humanos é o facto de não haver uma proteína correspondente no leite materno.<sup>14,22,24</sup>

#### 1.3.1.2. $\alpha_2$ -Caseína

A  $\alpha_2$ -caseína encontra-se presente no leite de vaca em baixas quantidades, 3 a 4g/dm<sup>3</sup>, é constituída por 207 resíduos de aminoácidos e possui um peso molecular de 25kDa. Apresenta 4 isoformas com diferentes quantidades de grupos fosforilo, isto é, A, B, C e D, sendo a isoforma A a mais comum.<sup>14,22,25</sup>

#### 1.3.1.3. $\beta$ -Caseína

A  $\beta$ -caseína é uma fosfoproteína, 24kDa, composta por 209 resíduos de aminoácidos e 5 resíduos de fosfato. Apresenta 12 variantes genéticas sendo as mais comuns as variantes A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e B.<sup>14,22,24</sup>

#### 1.3.1.4. k-Caseína

A k-caseína é a caseína menos fosforilada, contém, na sua estrutura, galactose, N-acetilgalactosamina e ácido N-acetilneuramínico. Apresenta propriedades anticoagulantes, previne a aglomeração de plaquetas e a secreção de serotonina.

#### 1.3.1.5. $\gamma$ -Caseína

A  $\gamma$ -caseína apresenta-se no leite de vaca nas frações  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  e  $\gamma_3$ , que são produtos da  $\beta$ -caseína quando proteolizada por plasmina.<sup>14,22</sup>

## 2. Soro de leite – *Whey*

O soro de leite era considerado pela indústria de lacticínios como um resíduo orgânico. Sabe-se, que em média, 1 a 2 kg de queijo produz 8 a 9 kg de soro de leite. Sendo produzido em elevadas quantidades, para além dos impactos ambientais provocados, comporta uma elevada despesa para a empresa.<sup>1,21,26</sup>

Ao longo dos anos tem-se vindo a descobrir os diversos potenciais que este resíduo alimentar apresenta. Possui um elevado teor de nutrientes naturais como proteínas, lactose e gorduras que podem ser reciclados por vários processos biotecnológicos e que, são maioritariamente usados como fertilizantes ou como componentes ou suplementos alimentares.<sup>1,4,13,21,26,27</sup>

O soro de leite é a substância líquida obtida quando se separa o coágulo de leite, nata ou leite desnatado sendo removido no processo de produção de queijo (soro de leite doce) e

durante a produção de produtos acidificados, como requeijão, iogurtes ou caseína (soro de leite ácido) e mais recentemente durante a microfiltração de leite desnatado (soro de leite nativo) e durante a produção tradicional de iogurtes gregos (soro de leite grego).<sup>1,4,28</sup>

O soro de leite encontra-se, comercialmente, sob diversas formas, nomeadamente: liofilizado, parcialmente liofilizado, com e sem lactose, desmineralizado e sob a forma de concentrado de proteínas de soro de leite.<sup>1,28</sup>

Diversos estudos<sup>29-32</sup> descobriram que o consumo de soro de leite com uma refeição, ou quando ingerido antes desta, diminuiu significativamente a glicemia pós-prandial e melhorou a resposta à insulina. Os benefícios do soro de leite são atribuídos aos péptidos e aos aminoácidos bioativos que são libertados durante a sua digestão e que criam ou interferem positivamente nos mecanismos de ação.<sup>28,32</sup> Estes dependem do tipo de soro utilizado e da metodologia experimental usada para a sua extração e purificação, assim como da metodologia usada para o fim ao qual o soro é destinado.<sup>28</sup>

## 2.1. Proteínas do soro de leite

O soro de leite apresenta uma mistura heterogénea de proteínas completa e diversificada, de elevada qualidade, contendo todos os aminoácidos essenciais e vários péptidos bioativos.<sup>1,4,28</sup> Estas proteínas derivam da corrente sanguínea e são sintetizadas na glândula mamária.<sup>33</sup>

O soro de leite apresenta propriedades biológicas e bioquímicas variadas que são responsáveis por muitos dos benefícios funcionais aplicados à saúde humana, como ajudar na perda de peso, no controlo dos índices de glicémia, na redução do colesterol, na diminuição da pressão sanguínea, na prevenção de flatulências, prisão de ventre, putrefação intestinal, e quando associado a um esforço físico intenso ajudam a desenvolver massa muscular, principalmente, em elementos do sexo masculino.<sup>4,13,21,26-28</sup> Entre esses benefícios destacam-se ainda os efeitos hipotensivos, antioxidante e hipocolesterolémico.<sup>1,4,28</sup>

As proteínas de soro de leite, que são cada vez mais usadas como um suplemento alimentar em diversas dietas, são uma fonte rica em aminoácidos de cadeia ramificada, como a leucina, a isoleucina e a valina, em aminoácidos essenciais, como a cisteína, e em péptidos.<sup>4,13,21,26-28</sup>

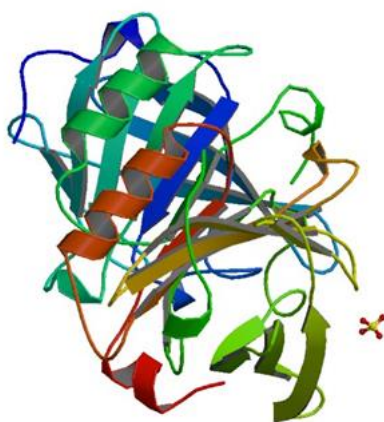
Uma das tecnologias mais utilizadas para separar a mistura proteica do soro dos restantes componentes é a tecnologia de membranas. Esta permite separar componentes como as proteínas, a lactose, o sal e a água. A ultrafiltração, por sua vez, permite concentrar as proteínas do soro e permite excluir as impurezas presentes no soro. Estes métodos apresentam diversos problemas uma vez que as proteínas ficam presas nos poros da membrana durante a ultrafiltração diminuindo assim a sua eficiência.<sup>26</sup>

As proteínas do soro apresentam uma elevada sensibilidade ao calor o que afeta a sua solubilidade e propriedades funcionais, e faz com que sejam facilmente desnaturadas.<sup>34,35</sup> Quando se encontram neste estado físico, o seu ponto isoelétrico (pI) aumenta e as proteínas interatuam mais facilmente entre si formando agregados de proteínas solúveis e insolúveis

levando à formação de depósitos.<sup>23,34,35</sup> Estas interações ocorrem devido à formação de pontes dissulfureto e devido à ocorrência de interações hidrofóbicas.<sup>23,34</sup>

### 2.1.1. $\beta$ -Lactoglobulina

A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), figura 1.2, é a proteína dominante do soro de leite, sendo responsável por 45 a 57% da constituição proteica total do soro e 10 a 15% das proteínas do leite, e é um dos alergénicos dominantes do leite de bovino. Esta proteína encontra-se ausente no leite materno podendo, este fator, ser um dos motivos apontados para a sua elevada taxa de alergenicidade em crianças. Contudo, a dieta da mãe durante a amamentação influencia a qualidade do leite. A alergia ao leite de vaca pode mesmo ocorrer durante a amamentação no caso de a mãe consumir leite de vaca ou produtos derivados.<sup>3,5,10–14,28,33,36</sup>



**Figura 1.2:** Estrutura terciária da  $\beta$ -lactoglobulina de bovino, com uma resolução de 1,8Å, obtida de *Protein Data Bank* (1BEB), segundo Brownlow.<sup>37</sup>

A  $\beta$ -Lg, membro da superfamília lipocalina e da subfamília dos transportadores de pequenas moléculas hidrofóbicas, é uma pequena proteína que apresenta, no seu estado nativo e a pH neutro, uma mistura de monómeros (18KDa) e dímeros (36KDa). Apresenta um ponto isoelétrico (pI) igual a 5,2 e uma cadeia polipeptídica simples com 162 resíduos de aminoácidos e apresenta na sua estrutura 16 resíduos de glutamina e 15 resíduos de lisina e possui, espalhados por toda a estrutura, diversos epítomos alergénicos e grupos positivos.<sup>10–12,14,16,26,33,36,38–40</sup> Possui também um grupo tiol livre (Cis 121) e uma ligação dissulfureto (Cis106-Cis119) que se encontram localizadas no núcleo hidrofóbico da proteína. Este é criado por duas cadeias- $\beta$  e coberto por uma hélice- $\alpha$  na superfície externa.<sup>38</sup>

A  $\beta$ -Lg apresenta duas isoformas, A e B, que diferem apenas num ponto de mutação, resíduo 64 e 118, respetivamente. No caso da isoforma A, existe uma valina na posição 64 em vez de um ácido aspártico ( $\beta$ -LgA); na isoforma B há, na posição 118, uma alanina em vez de uma glicina ( $\beta$ -LgB).<sup>5,12,41</sup> A proteína apresenta uma estrutura tridimensional composta por uma hélice- $\alpha$ , duas folhas- $\beta$  antiparalelas e seis folhas- $\beta$  paralelas, que, juntas, constituem um barril- $\beta$ . Estas estruturas secundárias são estabilizadas por duas pontes dissulfureto deixando um

resíduo de cisteína permanentemente livre. A sua estrutura única, assim como a sua elevada solubilidade em água e afinidade para estabelecer ligações com diferentes moléculas, levam a propor a  $\beta$ -lactoglobulina como um veículo de ligação para diversos ligandos, como é o caso das vitaminas, ácidos gordos, fosfolípidos, compostos aromáticos e fármacos.<sup>10,11,36,39</sup>

A proteína possui vários locais de ligação que funcionam como um antioxidante leve. Quando ocorre a conversão de monómeros em dímeros, a  $\beta$ -Lg inicia a ação de proteção de lipoproteínas de baixa densidade contra a oxidação induzida pelo cobre. Porém, quando se dá a reticulação dos grupos tiol livres provocada pelo tratamento térmico ou quando ocorre um bloqueio provocado pelo tratamento químico, o poder antioxidante da proteína reduz-se substancialmente.<sup>14,33,38</sup>

Até agora são conhecidos quatro potenciais locais de ligação da proteína: (i) a cavidade central do barril- $\beta$ ; (ii) a bolsa hidrofóbica que é colocada dentro do barril- $\beta$  e da hélice- $\alpha$ ; (iii) um local de superfície próximo da entrada do barril- $\beta$  e perto dos resíduos Trp19-Arg124; (iv) uma área na interface de dimerização.<sup>10</sup>

A  $\beta$ -lactoglobulina apresenta alguma atividade biológica, funciona como inibidor da enzima de conversão da angiotensina, possui uma atividade anticarcinogénica e antimicrobiana, possui um efeito hipocolesterolémico e metabólico. Pensa-se também que a proteína tenha um papel importante no transporte de retinol no intestino, que esteja envolvida no metabolismo do fosfato na glândula mamária e que seja responsável pela transferência de imunidade passiva nos recém-nascidos. Contudo a proteína apresenta outras funções biológicas que ainda não são conhecidas.<sup>10,33,36,40</sup>

Diversos estudos que promovem a redução da alergenidade da  $\beta$ -Lg, como a hidrólise enzimática, o tratamento térmico e o tratamento a alta pressão, baseiam-se na modificação da estrutura da proteína ou na destruição dos epítomos alérgicos. Em certos casos, ocorre a destruição da estrutura terciária e consequentemente uma alteração na função biológica como uma proteína transportadora. Contudo, a existência de ligações intramoleculares, mantêm a integridade estrutural da proteína quando é sujeita ao tratamento térmico e à hidrólise, contribuindo para o aumento da alergenidade.<sup>10,13</sup>

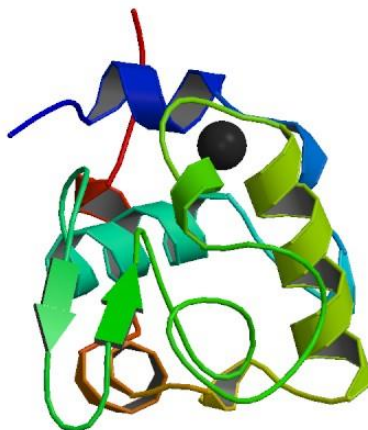
Um dos grandes problemas associados à  $\beta$ -Lg é a sua resistência à digestão gástrica. Após passar pelo estômago, a proteína permanece intacta, desencadeando uma resposta alérgica.<sup>33</sup>

### 2.1.2. $\alpha$ -Lactoalbumina

A  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La), figura I.3, proteína menos alérgica do que a  $\beta$ -Lg, é a segunda proteína dominante do soro de leite representando 15 a 25% da sua constituição proteica.<sup>3,4,14,28,42</sup> A sua cadeia é constituída por 123 resíduos de aminoácidos e possui um peso molecular de 14,2kDa.<sup>4,14,43</sup> A  $\alpha$ -La apresenta na sua estrutura 8 resíduos de glutamina, 12 resíduos de lisina e grandes quantidades de cistina (a forma oxidada da cisteína) e de triptofano.<sup>4,14,26</sup> Contém o maior teor de triptofano, entre todas as fontes proteicas alimentares, que é um precursor da serotonina que, por sua vez, interfere com o sistema nervoso central



melhorando o humor e reduzindo o *stress*.<sup>14,43</sup> A  $\alpha$ -La tem também um papel ativo na formação de lactose e possui a capacidade de se ligar a certos minerais, tais como o cálcio, o cobalto, magnésio e zinco, afetando positivamente a sua absorção.<sup>4,14,43</sup>



**Figura I.3:** Estrutura terciária da proteína  $\alpha$ -lactoalbumina, com uma resolução de 2,3Å, obtida no programa *Protein Data Bank* (1HFZ), segundo Pike.<sup>44</sup>

A  $\alpha$ -lactoalbumina é uma albumina solúvel em água, possui teores elevados de aminoácidos contendo enxofre, que afetam positivamente a regeneração e os processos de regulação do crescimento celular.<sup>14</sup>

A estrutura secundária da  $\alpha$ -La, após atingir a sua temperatura de desnaturação, sofre uma alteração permanente a nível estrutural, não voltando a formar a estrutura terciária mesmo que a temperatura baixe.<sup>42</sup> A estrutura desnaturada contém uma grande proporção de estruturas helicoidais, mas diferentes da estrutura da proteína no seu estado nativo.<sup>42</sup>

### 2.1.3. Outros constituintes proteicos

O soro de leite, para além da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -albumina, contém na sua constituição proteica a imunoglobulina (10 a 15%), o glicomacropéptido (10 a 15%), a albumina de soro bovino (10%), a lactoferrina (aproximadamente 1%), a lactoperoxidase (menos de 1%) e quantidades vestigiais de lisozima e de transferrina.<sup>3,4,13,21,28</sup>

#### 2.1.3.1. Imunoglobulinas (Ig)

As imunoglobulinas (Ig) são proteínas de elevado peso molecular, que pode variar de 150 a 1000kDa.<sup>4,45</sup> Estes anticorpos são produzidos quando o organismo está sujeito à ação de um vírus, uma bactéria ou antígenos animais.<sup>14</sup> As imunoglobulinas são dirigidas contra diferentes tipos de antígenos e apresentam cinco classes diferentes (IgA, IgG, IgM, IgE e IgD), sendo detetadas tanto no soro como no lúmen e parede intestinal.<sup>14,43</sup>

As Ig constituem, aproximadamente, 90% da globulina total de leite, são facilmente desnaturadas, e desempenham um papel importante na imunização passiva e atividade antioxidante de descendentes de mamíferos.<sup>4,14,43</sup> No leite bovino, a IgG é a imunoglobulina principal constituindo cerca de 80% da sua composição total. No caso do leite humano, a imunoglobulina principal é a IgA que constitui mais de 90% do total das Ig.<sup>4,43</sup>

#### **2.1.3.2. Glicomacropeptídeo (GMP)**

O glicomacropeptídeo (GMP), com um peso molecular de 6,7kDa, deriva da digestão da k-caseína pela ação da quimosina durante o processo de coagulação do queijo.<sup>4,46,47</sup>

O peptídeo GMP é resistente ao calor, à digestão e às alterações de pH, apresenta um elevado teor em aminoácidos essenciais e uma elevada carga negativa, que favorece a absorção de minerais pelo epitélio intestinal.<sup>4,21,47,48</sup>

Uma vez que o GMP é um componente biologicamente ativo e possui propriedades químicas e funcionais únicas, ganhou muita atenção na última década. O GMP apresenta um conjunto de aminoácidos únicos que o tornam um ingrediente muito procurado, tanto na indústria alimentar, como na área nutricional.<sup>47</sup>

Para além disso possui diversas propriedades funcionais como uma ampla solubilidade na gama de pH, assim como propriedades emulsionantes e de formação de espuma, que se mostram promissoras para a aplicação do péptido na indústria de alimentar.<sup>47</sup>

#### **2.1.3.3. Albumina de Soro Bovino (BSA)**

A albumina de soro bovino (BSA) é um péptido de elevado peso molecular, 66kDa, rico em cisteínas, sendo um precursor relevante na síntese de glutatona.<sup>4,43</sup> A BSA é semelhante a  $\alpha_1$ -caseína,  $\alpha_2$ -caseína e  $\beta$ -caseína e  $\alpha$ -lactalbumina.<sup>14</sup> Esta proteína favorece o transporte de ácidos gordos livres e outros lipídeos pela corrente sanguínea devido à sua elevada afinidade com estes compostos.<sup>4,43</sup> Quando sujeita a uma gama de temperaturas compreendidas entre 70°C e 80°C, encontra-se inativa, contudo, de todas as proteínas do leite, a BSA é a única que permanece imunorreativa após o tratamento térmico.<sup>14,43</sup>

#### **2.1.3.4. Lactoferrina**

A lactoferrina, 80kDa, é uma glicoproteína única que possui dois grupos de carboidratos. É sintetizada pelas células epiteliais secretoras da glândula mamária, sendo a sua principal função ligar e transportar o ferro para o sistema vascular intestinal. É particularmente importante em mulheres grávidas e em pessoas com um estilo de vida mais ocupado, uma vez que devido à sua capacidade de ligação ao ferro livre, exerce um efeito bacteriano, inibe o crescimento de agentes patogénicos e estimula o desenvolvimento da mucosa intestinal no recém-nascido.<sup>14,43</sup>

A lactoferrina apresenta funções imunes, participa em processos de desintoxicação e acima de tudo tem um efeito antineoplásico, inibindo a ligação de fatores de crescimento tumoral.<sup>14,43</sup>

Devido à sua capacidade de complexar ferro livre, os três apotransferrinas exercem um efeito bacteriostático *in vitro*.

Eles podem funcionar como proteínas de transporte de ferro, e as lactoferrinas também podem possuir uma função mitogênica e estimular o desenvolvimento da mucosa intestinal no recém-nascido.

#### **2.1.3.5. Lactoperoxidase**

A lactoperoxidase é uma enzima biologicamente ativa que possui uma atividade semelhante à de um antibiótico. É uma oxidoreductase com função antibacteriana, inibidor de crescimento viral e agente antineoplásico.<sup>14,43</sup>

#### **2.1.3.6. Lisozima**

A lisozima extraída do leite bovino é, aparentemente, diferente, tanto em peso molecular como na constituição de aminoácidos, da lisozima extraída do leite humano. Esta proteína, assim como a lactoperoxidase, apresenta uma atividade semelhante à de um antibiótico. Esta enzima lisa, particularmente, as bactérias gram positivas existentes no leite, possuindo ainda propriedades antivirais e anti-inflamatórias.<sup>14,43</sup>

#### **2.1.3.7. Transferrina**

A transferrina é uma glicoproteína que tem a capacidade de se ligar ao ferro e assim transferi-lo para os tecidos. Quando o ferro chega aos músculos é usado para fazer a biossíntese de citocromos e de mioglobina, enquanto na medula óssea, o ferro é usado na produção de hemoglobina.<sup>14,43</sup>

### **2.2. Aplicações do soro de leite na indústria alimentar**

O soro de leite é muito usado na indústria alimentar como um suplemento que tem como função principal melhorar e potenciar as propriedades do produto final.<sup>35</sup>

As suas proteínas são usadas como enriquecedores proteicos, no caso do leite, e como suplemento alimentar na confeção de iogurtes, queijos e outros produtos coagulados. A adição destas proteínas melhora as propriedades físicas e microestruturais dos constituintes e consequentemente altera as propriedades funcionais do produto final.<sup>33,34</sup>

As proteínas do soro são também introduzidas nos alimentos a fim de fornecerem aminoácidos que não se encontram disponíveis no alimento no seu estado nativo. Estas proteínas podem então ser aplicadas na produção de carne processada, produtos de pastelaria

e confeitaria, massas, gelados, bebidas, sobremesas e na alimentação infantil.<sup>33,35</sup> A crescente necessidade da utilização de proteínas inovadoras, funcionalmente superiores e nutricionalmente excelentes pela indústria alimentar, oferece uma oportunidade potencial para o aumento da utilização de proteínas do soro de leite.<sup>1,35</sup>

Contudo, o soro de leite apresenta também algumas desvantagens. Quando adicionado em excesso, provoca um sabor desagradável e confere uma textura granulada ao produto final, o que nem sempre é pretendido. Este fenómeno deve-se à formação de ligações covalentes dissulfídricas que aumentam proporcionalmente à concentração de proteínas do soro em solução provocando a formação de partículas proteicas de maiores dimensões.<sup>34</sup>

Devido aos variados benefícios para a saúde humana que as proteínas do soro de leite apresentam, o seu consumo com finalidade terapêutica tem aumentado exponencialmente nos últimos anos.<sup>21</sup>

### **3. Tratamentos aplicados ao soro de leite para uma diminuição da alergenidade**

#### **3.1. Aplicação de micro-ondas**

O tratamento por micro-ondas aplicado à indústria alimentar é um tratamento recente que tem vindo a crescer ao longo dos anos. A aplicação de micro-ondas é apontada como uma alternativa aos tratamentos térmicos utilizados neste tipo de indústrias.<sup>49-51</sup>

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas com frequência adequada aos níveis energéticos rotacionais moleculares. O aquecimento é feito através da absorção dessa energia pela rotação de moléculas de água bipolares e através da translação de componentes iónicos das proteínas<sup>49-51</sup>.

Deste modo, fica perceptível a influência que este tipo de radiação tem sob a estrutura das proteínas. Assim, a radiação de micro-ondas, é usada para acelerar a hidrólise das proteínas e tem-se mostrado eficaz para o mapeamento da estrutura primária das mesmas, através da digestão pela tripsina<sup>49</sup>. Este tipo de radiação é usado para acelerar o processo de digestão proteico, onde os métodos tradicionais demoram horas, conseguindo com este tipo de tratamentos diminuir o tempo de reação para minutos<sup>49-51</sup>.

O tratamento por micro-ondas tem sido recentemente usado na indústria de lacticínios uma vez que acelera o processo de hidrólise da  $\beta$ -lactoglobulina auxiliando assim na redução do seu potencial alérgico<sup>49,51</sup>.

#### **3.2. Aplicação de Ultrassons**

O tratamento com ultrassons é um processo económico e ambientalmente amigável que oferece um bom produto final que pode ser utilizado em vários tipos de comida e bebidas<sup>16,52</sup>.

Assim, os ultrassons também podem ser usados, em conjunto com outras metodologias, para a diminuição do potencial alergénico das proteínas do leite.<sup>53</sup>

A aplicação de ultrassons pode ser feita através de um banho ou de uma sonda de ultrassons<sup>54</sup>.

### 3.2.1. Banho de Ultrassons

O banho de ultrassons, apesar de ser um método bastante utilizado, apresenta algumas desvantagens. Utiliza valores de irradiação baixos, em intervalos de 25 a 45kHz ou de 35 a 130kHz, e apresenta uma distribuição da intensidade de ultrassons heterogénea<sup>54</sup>.

É também necessário, antes da aplicação do tratamento, ter em conta algumas variáveis: (i) o tamanho da partícula, (ii) o tempo de sonicação, (iii) a frequência da energia de sonicação, (iv) a temperatura da água dentro do banho e (v) a utilização de detergentes na água do banho, que podem potenciar a transmissão dos ultrassons através do líquido.<sup>54</sup>

### 3.2.2. Sonda de Ultrassons

A sonda de ultrassons é imersa diretamente na solução onde ocorre a sonicação. A energia fornecida pela sonda é, pelo menos, 100 vezes superior à fornecida pelo banho de ultrassons.<sup>54</sup>

A aplicação de ultrassons focalizados de alta intensidade (*High Intensity Focused Ultrasound* – HIFU) permite acelerar a digestão de proteínas. Aqui é importante ter em conta (i) o diâmetro da sonda, (ii) a concentração da enzima e (iii) a temperatura da solução onde se dá a digestão proteica<sup>54</sup>.

A aplicação de ultrassons com o objetivo de reduzir a presença de proteínas alergénicas no leite é possível e pode ser vantajosamente estendida à indústria alimentar. Esta técnica permite, através da regulação da amplitude dos ultrassons, controlar o grau de hidrólise, tendo em conta o dispositivo específico utilizado.<sup>55</sup>

Com a aplicação deste tratamento e os diferentes graus de hidrólise, podem ser obtidos dois tipos de produtos: um hidrolisado completo sem alergenicidade e um hidrolisado parcial com reduzida ou nenhuma alergenicidade. Esta metodologia também permite isolar e concentrar peptídeos bioativos com diversas aplicações funcionais que podem variar desde a indústria farmacêutica à indústria alimentar.<sup>55</sup>

No entanto, esta metodologia, também apresenta desvantagens dado que, durante a aplicação da técnica, geram-se radicais hidroxilos. Assim, são usados aditivos para minimizar a formação desses radicais.

## 3.3. Tratamento térmico

A  $\beta$ -lactoglobulina é rotineiramente exposta a temperaturas elevadas durante todo o processo de confeção de leite comercial onde, o tratamento térmico promove a desnaturação e

agregação da proteína, assim como promove a reação de Maillard (sub-capítulo 3.5) com outras moléculas.<sup>6,12,38</sup> A proteína, quando sujeita a temperaturas elevadas, durante um determinado intervalo de tempo, desencadeia um mecanismo de desdobramento complexo levando à formação de pequenos aglomerados bem definidos. Estes aglomerados apresentam um tamanho que é independente da concentração, da temperatura e da força iónica da solução.<sup>3,12</sup> Das proteínas do leite a mais estável ao calor é a caseína, no caso das proteínas do soro de leite as menos sensíveis ao calor, por ordem decrescente, são as imunoglobinas (Ig), a albumina de soro bovino (BSA), a  $\beta$ -lactoglobulina e por fim a mais sensível, é a  $\alpha$ -lactoalbumina.<sup>3,6</sup>

A agregação da proteína começa a surgir a partir dos 65 a 75°C, aqui, o dímero não se converte em monómero, e adota a conformação de “glóbulo fundido”.<sup>38</sup> Este processo, resulta na perda da estrutura  $\alpha$ -helicoidal e exposição do resíduo Cis 121 da  $\beta$ -Lg que, promove a formação de novas ligações dissulfídicas e, consequente, agregação. O mecanismo de todo este processo ainda não é bem conhecido, supõem-se que, os radicais livres e as trocas tiol-dissulfeto, tenham um papel fundamental em todo o processo.<sup>34,38</sup>

Com o aumento da temperatura, de 50°C a 90°C, a antigenicidade da  $\alpha$ -lactoalbumina e da  $\beta$ -lactoalbumina aumenta. Este aumento da antigenicidade pode ocorrer devido à exposição dos epítomos alérgicos que se encontram camuflados pela estrutura 3D da proteína e quando esta é exposta a estas temperaturas, desnatura e ocorre o desdobramento da estrutura conformacional, expondo os epítomos alérgicos.<sup>3,6,56</sup> Contudo, quando a temperatura é superior a 90°C, a antigenicidade das duas proteínas diminui drasticamente. Neste caso, os epítomos alérgicos expostos à superfície da molécula, são destruídos ou camuflados.<sup>3,6,56</sup>

Durante a desnaturação térmica pode ocorrer hidrólise, que destrói a estrutura terciária da  $\beta$ -Lg e remove alguns dos epítomos alérgicos, diminuindo assim a alergenidade da proteína.<sup>10,12</sup>

Após a desnaturação, as moléculas de  $\beta$ -Lg, apresentam um grande número de grupos tiol livres que ficam disponíveis para formar as ligações dissulfídicas.<sup>34,38</sup>

A alteração dos alérgicos proteicos do leite, através dos tratamentos térmicos, é influenciada (i) pela composição do leite, (ii) pelas condições de processamento, (iii) pelas circunstâncias de exposição ao consumidor e (iv) pela composição genética do indivíduo.<sup>6,57</sup>

Em suma, com o aumento da temperatura, a alergenidade de várias proteínas alimentares diminui através da alteração da conformação de proteínas lábeis ao calor, destruindo os epítomos alérgicos.<sup>6,57</sup>

### 3.4. Tratamento a alta pressão

O tratamento a alta pressão é uma técnica recente no processo de produção alimentar e está a surgir como um dos potenciais substitutos do tratamento térmico.<sup>58,59</sup> As altas pressões são normalmente aplicadas na gama de 300 a 1000MPa à temperatura ambiente ou

ligeiramente acima dela.<sup>58</sup> Esta técnica foi inicialmente aplicada na eliminação de microorganismos. No entanto, este tipo de tratamento pode originar alterações estruturais, como a desnaturação e a formação de agregados, nas proteínas do leite, que podem influenciar o seu potencial alergénico.<sup>6,41,53,59-62</sup>

Ao sujeitar o leite a uma pressão elevada, 200 a 600MPa, a diferentes temperaturas, 30 a 68°C, consegue-se melhorar a antigenicidade da  $\beta$ -lactoglobulina no soro de leite.<sup>6,49,62,63</sup> Assim, quando se sujeita o soro, e consequentemente a  $\beta$ -lactoglobulina, a uma variação de pressão de 200 a 400MPa, dá-se um aumento da ligação de anticorpos à proteína.<sup>6,49,53,62,63</sup>

O aumento da antigenicidade registado com este tratamento pode ser associado à exposição de epítomos alergénicos que se encontram ocultos no interior da molécula da proteína. Assim, após o tratamento a alta pressão, os epítomos ficam disponíveis para se ligar aos anticorpos devido à alteração estrutural induzida na proteína pelas elevadas pressões a que foi sujeita.<sup>6,62</sup>

As alterações provocadas nas proteínas pela pressão elevada tornam mais fácil a digestão enzimática. A  $\beta$ -lactoglobulina consegue ser eficientemente hidrolisada por diversas proteínas sob uma pressão elevada, exibindo uma antigenicidade reduzida.<sup>6,60</sup> Quando se sujeita o leite a uma pressão elevada, a hidrólise das proteínas do soro aumenta e consequentemente há uma diminuição da alergenicidade dos hidrolisados residuais.<sup>6,41,59,60,62</sup>

A aplicação deste tratamento durante a hidrólise enzimática pode provocar uma diminuição da alergenicidade e das propriedades de ligação do anticorpo às proteínas do soro de leite hidrolisado. Esta redução da alergenicidade ocorre, devido ao aumento da acessibilidade das regiões hidrofóbicas potencialmente imunogénicas para a enzima, resultando num aperfeiçoamento da hidrólise.<sup>6,60,62</sup>

Em suma, o uso do tratamento a alta pressão durante a hidrólise de proteínas do leite pode ser usado como uma estratégia eficaz para a produção de hipoalérgicos hidrolisados de soro de leite.<sup>6,61,62</sup>

### 3.5. Reação de Maillard e glicação

A conjugação de proteínas com açúcares redutores através da reação de Maillard melhora as propriedades funcionais destas. A reação de Maillard parece ser, também, um método promissor para mascarar as propriedades alergénicas dos alimentos.<sup>6,64</sup>

A conjugação da  $\beta$ -lactoglobulina com o carboximetil dextrano (CMD) melhora as propriedades emulsionantes e a estabilidade térmica, e reduz a imunogenicidade da proteína. A conjugação com o CMD foi usada para induzir a exposição da região hidrofóbica e melhorar a flexibilidade da molécula proteica, assim a interação com o ácido oleico no momento da emulsificação é melhorada. Deste modo, a atividade emulsificante da  $\beta$ -lactoglobulina, a pH neutro é melhorada substancialmente.<sup>64,65</sup>

A diminuição da alergenicidade de proteínas do leite pela reação de Maillard depende do peso molecular dos sacáridos e da quantidade de sacarídeos conjugados com proteínas. Os conjugados  $\beta$ -Lg-CMD com uma maior percentagem de sacarídeos provoca uma diminuição da



imunogenicidade, assim como a conjugação com CMD de elevado peso molecular.<sup>6,64,66</sup> A redução da alergenidade da proteína ocorre devido aos epítomos alérgicos serem mascarados pelo CMD.<sup>64,67,68</sup>

As alterações na antigenidade das proteínas do leite são, também, associadas às condições, e ao grau, da reação de Maillard. A conjugação de proteínas do soro do leite com a glucose diminui a antigenidade da  $\beta$ -lactoglobulina e da  $\alpha$ -lactoalbumina.<sup>6,68-70</sup> A diminuição da alergenidade pode ser controlada pela regulação (i) do rácio em peso de proteína-açúcar, (ii) pela temperatura e (iii) pelo tempo de reação. Nas condições de reação ótimas consegue-se atingir um rendimento de 90%.<sup>6,68-70</sup> Deste modo podemos concluir que, a alergenidade das proteínas do leite pode ser significativamente reduzida, através da conjugação com sacarídeos, através do controlo da reação de Maillard.<sup>6,64</sup>

Contudo, podem surgir novos epítomos como resultado da exposição de regiões hidrofóbicas das proteínas, que se encontram submersas na fase nativa devido à conjugação.<sup>64,66,68</sup>

### 3.6. Fermentação ácido-láctica

A hidrólise de proteínas de leite pela fermentação ácido-láctica tem efeitos importantes na digestibilidade do leite e na produção de péptidos bioativos. Durante a fermentação ácido-láctica são produzidas enzimas proteolíticas. O sistema proteolítico da fermentação é um processo complexo composto por proteinases, peptidases e sistemas de transporte. A proteólise vai quebrar alguns dos epítomos alérgicos das proteínas e consequentemente diminuir a alergenidade do leite.<sup>6,18</sup>

As propriedades antigénicas das proteínas do leite são reduzidas por vários tipos de bactérias produtoras de ácido láctico em que, as alterações provocadas na antigenidade e alergenidade de proteínas do leite dependem das espécies bacterianas, assim como das condições em que ocorre a fermentação.<sup>6,18</sup>

A fermentação ácido-láctica atenua a antigenidade de  $\beta$ -lactoglobulina até 90% no leite magro e até 70% no soro de leite. A diminuição da antigenidade das proteínas do soro de leite sugere que, durante o processo de fermentação, alguns epítomos alérgicos das proteínas são destruídos devido à hidrólise de enzimas proteolíticas de *Lactobacillus*.<sup>6,18</sup>

### 3.7. Digestão de proteínas

#### 3.7.1. Digestão química



A hidrólise pode ser conseguida através de processamento químico no qual tanto bases quanto ácidos podem ser utilizados. Os ácidos, sendo mais eficazes, são tradicionalmente mais utilizados pela indústria alimentar.<sup>18,70,71</sup>

A desnaturação química, ou hidrólise, é induzida pela adição de desnaturantes, como o ditioneitol (DTT) e o  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me), que clivam as ligações dissulfureto.<sup>72</sup> Quando ocorre a desnaturação química da proteína, há um rearranjo da estrutura da molécula, ocultando assim os epítomos alergénicos presentes na estrutura ou, até mesmo, removendo-os da estrutura proteica.<sup>72</sup> A proteína reduz assim a sua capacidade alergénica uma vez que os seus epítomos alergénicos já não conseguem desencadear a resposta alergénica no sistema imunitário humano.<sup>73</sup>

No entanto, o método da digestão química apresenta diversas desvantagens, uma vez que a hidrólise de aminoácidos essenciais, como o triptofano, lisina e treonina, compromete o valor biológico do produto final.<sup>18,70,71</sup> Por outro lado o processamento químico, contribui para um sabor desagradável e salgado do produto final, quando o hidróxido de sódio é adicionado para contrabalançar o efeito do ácido clorídrico, após a desnaturação das proteínas.<sup>18</sup>

O processo de digestão química também não reuniu uma boa aceitação pela indústria alimentar uma vez que é menos seguro para o consumidor do que os métodos alternativos já existentes.<sup>18</sup>

### 3.7.2. Digestão enzimática ou Hidrólise enzimática

A hidrólise é conhecida como um dos métodos que permite reduzir a alergenicidade de proteínas.<sup>3,6</sup> O aquecimento e tratamento proteolítico das proteínas do soro podem remover os epítomos conformacionais, como resultado da perda de estrutura terciária, diminuindo o seu potencial alérgico<sup>3,12,49,74</sup>. Contudo, a digestão enzimática de proteínas pode originar novas substâncias antigénicas.<sup>3,6,74-76</sup>

No caso da hidrólise enzimática, adiciona-se ao soro uma enzima, que vai quebrar as proteínas, formando aglomerados mais pequenos, destruindo a estrutura terciária e consequentemente removendo alguns epítomos alergénicos.<sup>3,6,12,74</sup>

A proteólise oferece um método eficiente para destruir a alergenicidade dos epítomos alergénicos. Para reduzir a alergenicidade, as proteínas, são quebradas pelas enzimas em proteínas mais pequenas ou em aminoácidos.<sup>3,6</sup>

Foram já experimentadas diversas enzimas, quer individualmente quer em conjunto. Nos primeiros produtos preparados recorreu-se à utilização de enzimas digestivas, como a tripsina, a pepsina e a quimotripsina, na tentativa de imitar os processos digestivos.<sup>3,75-77</sup> Vários estudos mostram que, com a combinação de algumas destas enzimas, obtêm-se resultados mais eficientes quando comparados com tratamentos que utilizam apenas uma enzima. Também são utilizadas enzimas de origem bacteriana e fúngica, que são mais específicas e mais fáceis de obter em grande quantidade<sup>14,75-78</sup>.

É a especificidade da enzima, e não o grau de hidrólise ou a distribuição da massa molecular dos hidrolisados, que determinam a antigenicidade residual das proteínas do soro de

leite. Sendo assim, é essencial escolher a enzima mais apropriada, tendo em conta a especificidade dos epítomos antigénicos, a fim de reduzir a alergenidade das proteínas.<sup>6</sup>

Conjugando a hidrólise enzimática com o tratamento térmico, aumentamos notavelmente a hidrólise triptica e peptídica da  $\beta$ -lactoglobulina. Esta combinação de tratamentos expõe os locais de clivagem resultantes da desnaturação térmica e do aumento da suscetibilidade à proteólise da proteína, reduzindo assim, a alergenidade do leite.<sup>3,6,75,79</sup>

Em suma, a hidrólise enzimática pode, efetivamente, diminuir parcialmente a alergenidade das proteínas do soro de leite.<sup>3,6,74</sup>

### 3.8. Reticulação Enzimática

As ligações cruzadas, ou reticulação, entre as várias proteínas alimentares potenciam a estabilidade dos alimentos. Este tipo de ligações, que podem ocorrer por via natural ou por processamento, têm sido testadas e implementadas na indústria alimentar, como é o caso das indústrias dos cereais, laticínios, carne e na transformação de pescado.<sup>16</sup>

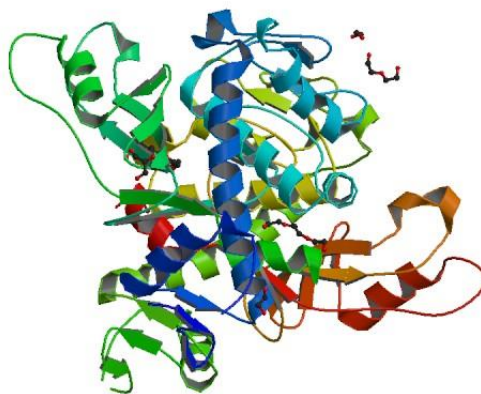
As enzimas, que são usadas como substitutas dos produtos físicos e químicos, são sugeridas como agentes de reticulação de proteínas devido à sua elevada especificidade, condições reacionais suaves e baixo risco de formação de produtos tóxicos.<sup>16</sup>

Existem diversas enzimas que permitem a reticulação de proteínas do soro de leite, como a peroxidase de rábano, a fenol oxidase, a sulfidril oxidase, a tirosinase, a lacase e a transglutaminase.<sup>16,26</sup> A mais utilizada é a transglutaminase<sup>26,80</sup> uma vez que é a única enzima aprovada pela União Europeia para o mercado alimentar.<sup>16,81,82</sup>

Contudo, a adaptação de estruturas de proteínas, muito utilizada nesta indústria, para a criação de propriedades funcionais novas e melhoradas pode provocar um efeito contrário ao desejado. Estas alterações estruturais, para além de otimizarem o produto na medida desejada, correm o risco de potenciar a criação de alimentos com um potencial alergénico maior.<sup>16</sup> Desta forma, todas as novas proteínas e derivados precisam de ser novamente testados quanto à sua alergenidade antes de serem lançados no mercado.<sup>16</sup>

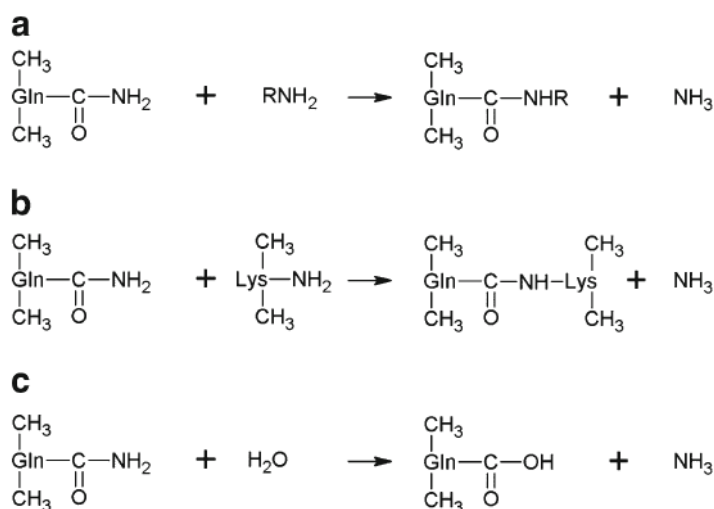
#### 3.8.1. Transglutaminase

A utilização da transglutaminase, EC 2.3.2.13, (figura I.4) é muito frequente na indústria de laticínios tanto uma vez que catalisa vários tipos de reações alimentares, diminuindo o seu tempo de reação, e é uma enzima que apresenta custos de produção e de aquisição reduzidos. A transglutaminase é usada no soro de leite, mais especificamente, uma vez que aumenta e melhora as propriedades funcionais das suas proteínas, como a elasticidade, capacidade de reter água, a estabilidade ao calor, a formação de espuma e a atividade emulsificante.<sup>26,35,83,84</sup>



**Figura I.4:** Estrutura terciária da enzima transglutaminase, com uma resolução de 1,85Å, obtida de *Protein Data Bank* (4P8I), segundo Fernandes.<sup>85</sup>

A transglutaminase (TG) ou proteína-glutamina  $\gamma$ -glutamil-transferase é usada para catalisar a reticulação de proteínas sem ser necessário recorrer à adição de mediadores que potenciem a catálise enzimática. Esta enzima é capaz de reticular a  $\beta$ -lactoglobulina e a  $\alpha$ -lactoglobulina, através da formação de ligações cruzadas intramoleculares e intermoleculares  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lisina (figura I.5). A TG catalisa a reação de transferência de grupos acilo entre o grupo  $\gamma$ -carboxamida de um resíduo de glutamina ligado a um péptido, dadores do grupo acilo e uma variedade de aminas primárias, aceptadores do grupo acilo, incluindo o grupo amina da lisina. Quando o grupo  $\epsilon$ -amina de um resíduo lisina ligado ao péptido é o substrato, as cadeias peptídicas são ligadas covalentemente através de ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lisina (figura I.5). Desta forma há a formação de polímeros, constituídos pelas proteínas do soro, que apresentam um peso molecular elevado.<sup>26,35,72,76,78,80,84</sup>



**Figura I.5:** Mecanismos das reações catalisadas pela transglutaminase. **a)** Reação de transferência do grupo acilo. **b)** Reação de reticulação entre os resíduos de glutamina (Gln) e de lisina (Lys) de proteína ou péptidos. **c)** Reação de desaminação.<sup>84</sup>

Contudo, devido à estrutura globular compacta das proteínas do soro de leite, a transglutaminase não consegue aceder a todos os resíduos das proteínas diminuindo o rendimento da reação de reticulação. Para superar este problema é necessário proceder-se a pré-tratamentos, químicos ou térmicos, a fim de desnaturar as proteínas. Deste modo a enzima consegue entrar em contacto com todos os resíduos aumentando a eficiência da reação de reticulação.<sup>26,80,84</sup>

As proteínas do soro reticuladas pela transglutaminase podem ser adicionadas a alimentos como um ingrediente funcional melhorando as propriedades funcionais destes. No caso específico da  $\beta$ -lactoglobulina, a polimerização do soro pela transglutaminase pode reduzir o seu potencial alergénico sem ser necessário recorrer à remoção posterior desta proteína, o que constitui uma vantagem considerável em termos de processamento industrial.<sup>26,84</sup>

### 3.8.1.1. Pré-tratamentos

A reticulação enzimática quando aplicada à  $\beta$ -Lg apresenta uma eficiência de reação baixa, uma vez que a proteína possui uma estrutura terciária extremamente compacta que vai impedir a enzima de aceder a todos os epítomos alergénicos. A fim de resolver este problema são aplicados pré-tratamentos de modo a desnaturar a proteína tornando os locais alvo da enzima disponíveis para que a reação ocorra.<sup>16,75,78,80,86</sup> A desnaturação pode ocorrer química ou termicamente.<sup>72,80</sup>

A desnaturação química ocorre pela adição de compostos químicos, como o ditioneitol (DTT) ou o  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me), que clivam as ligações dissulfídicas. Neste caso, dá-se um desequilíbrio na conversão monómero-dímero, sem que ocorra qualquer alteração nas hélices- $\alpha$ , a fim de aumentar a concentração de monómeros em solução. Deste modo a proteína fica mais acessível à ação da transglutaminase.<sup>72</sup>

A desnaturação térmica, na qual se sujeita o soro de leite a uma temperatura superior a 70°C durante um determinado intervalo de tempo, promove a dissociação das folhas- $\beta$  na estrutura nativa da proteína, levando à formação de novas folhas- $\beta$  intermoleculares.<sup>72,80,86</sup>

### 3.8.1.2. Inibidores e Potenciadores da Transglutaminase

A adição de suplementos a produtos alimentares tem vindo a aumentar com o passar dos anos. A fortificação de alimentos consiste na adição de um ou mais nutrientes essenciais aos alimentos com a finalidade de prevenir ou corrigir uma deficiência manifestada de um ou mais nutrientes na população ou em grupos específicos da população. É nas áreas em que os problemas de desnutrição são prevalentes que a utilização deste tipo de alimentos tem uma maior incidência. A utilização de alimentos enriquecidos é uma maneira eficaz de combater a deficiência de micronutrientes e de uma forma geral prevenir e corrigir deficiências num ou mais nutrientes na sociedade ou em grupos específicos da população.<sup>7,87</sup>

A fortificação de alimentos pode ocorrer com a finalidade de manter a qualidade nutricional dos alimentos, manter os níveis de nutrientes adequados, corrigir ou prevenir deficiências nutricionais específicas na população em geral ou em grupos em risco de certas deficiências, aumentar o valor nutricional adicionado de um produto e fornecer funções tecnológicas no processamento de alimentos. Os riscos associados à fortificação de produtos lácteos são muito reduzidos, exceto se não forem seguidas boas práticas de fabricação.<sup>7,87</sup>

A indústria alimentar, mais especificamente a de laticínios, tem-se focado, até ao momento, nas deficiências mais prevalentes, défice em vitamina A e C, iodo, cálcio e ferro.<sup>7-9,19,20,87</sup>

Nos últimos anos tem-se verificado que o consumidor está cada vez mais interessado na saúde e espera que os alimentos sejam saudáveis, ou até mesmo capazes de prevenir certas doenças, do que propriamente no sabor em si. Deste modo, e devido ao facto do consumo de leite fermentado e dos seus derivados ter aumentado exponencialmente em todo o mundo, os ingredientes com relevância funcional estão a ser incorporados nestes produtos lácteos de forma a aumentar o seu valor comercial e de certa forma como meio de incorporar os componentes nutricionais na dieta humana.<sup>7,87</sup>

A fortificação dos produtos lácteos com minerais como o cálcio, magnésio, zinco e ferro, podem oferecer uma ampla gama de opções que abordam os principais tópicos da saúde humana, como a saúde óssea, imunidade, anemia, energia ou funções cognitivas.<sup>2,7,9,19,20,87,88</sup> No entanto, uma vez que os produtos lácteos são uma matriz alimentar complexa, a viabilidade da adição mineral deve ser considerada.<sup>2,9,19,87</sup> Para além disso, a adição de suplementos minerais ao leite é limitante uma vez que, ao pH normal do leite, a fase solúvel dos minerais encontra-se saturada. Por outro lado, a adição excessiva de minerais pode provocar alterações a nível do sabor, textura, cor e da bioatividade do produto final, tornando-se, na maioria das vezes, desagradável para o consumidor final.<sup>2,7-9,19,20,88</sup>

A transglutaminase, quando adicionada a produtos lácteos fortificados com iões metálicos, sofre interferências na sua reação de reticulação das proteínas do leite.<sup>84</sup> Segundo estudos realizados por Ando<sup>89</sup> e Macedo<sup>90</sup> existem iões metálicos que inibem e que potenciam a atividade enzimática da transglutaminase. A sua atividade aumenta na presença dos iões zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), bário ( $\text{Ba}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), sódio ( $\text{Na}^+$ ), e diminui na presença de iões ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), mercúrio ( $\text{Hg}^{2+}$ ), chumbo ( $\text{Pb}^{2+}$ ) e manganês ( $\text{Mn}^{4+}$ ).<sup>84,89,90</sup>

#### **4. Aplicações da Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier à análise da estrutura secundária de proteínas**

As características estruturais das proteínas alimentares são frequentemente estudadas pela espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) com a finalidade de determinar a relação entre a sua função e a sua estrutura.<sup>40,59,91,92</sup> Esta técnica está estabelecida como uma das ferramentas para a caracterização estrutural dos mecanismos envolvidos no enrolamento e desenrolamento das proteínas.<sup>93,94</sup>

Devido à sua versatilidade e facilidade de manuseamento, a técnica de FTIR permite o estudo de proteínas globulares em solução aquosa, em sistemas complexos, como sistemas biológico ou no estado funcional, como um gel ou um filme, assim como de proteínas no estado sólido e em emulsões.<sup>40,59,91,93,95</sup> Esta técnica fornece uma ferramenta de diagnóstico sensível que permite monitorizar a natureza das mudanças que ocorrem na conformação da proteína.<sup>59,93,95</sup>

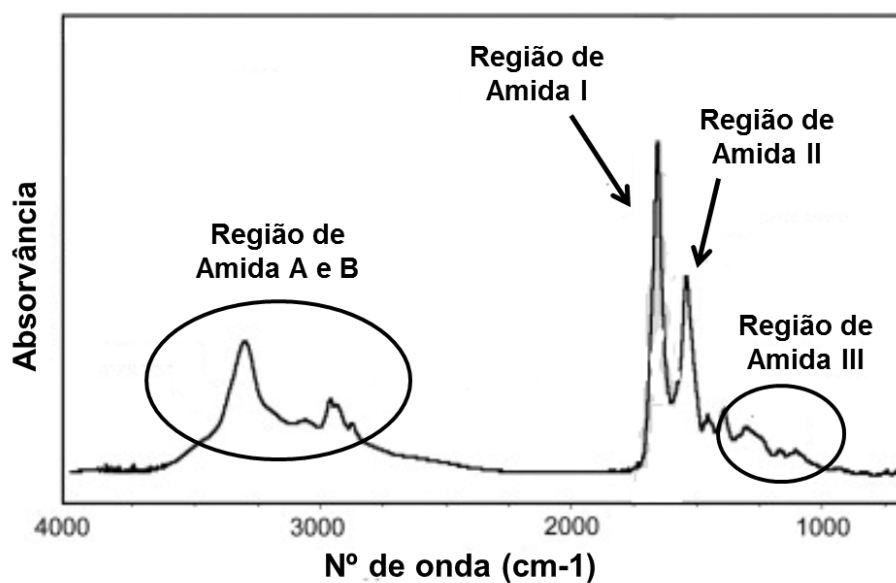
A espectroscopia de FTIR permite estudar diversos aspetos da estrutura proteica, como a sensibilidade ao calor, à pressão, às variações de pH, à desnaturação química, às modificações causadas devido ao ambiente aquoso em que a proteína está inserida, assim como para monitorizar o termotropismo de fosfolípidos e as interações com outros componentes das biomembranas.<sup>40,41,91</sup>

Esta técnica espetroscópica apresenta diversas vantagens proporcionadas pelos avanços na facilidade de utilização dos instrumentos de medição e da metodologia, o baixo custo do equipamento, o curto tempo de medição, a pequena quantidade de amostra necessária (entre 10µg a 100µg) e não apresenta limitações a nível do tamanho da proteína.<sup>93,94</sup> Contudo, a concentração da proteína em solução não pode ser superior a 50mg/mL.<sup>91</sup>

A principal desvantagem da espectroscopia de infravermelhos de soluções aquosas é a forte absorção da água na região do espectro de infravermelhos na zona de amida I, perto de  $1645\text{cm}^{-1}$ , que sobrepõe a importante banda de amida I e algumas bandas de corrente lateral. Quando estas bandas de proteínas são essenciais para a análise pretendida, a forte absorção da água requer um comprimento de percurso ótico curto para as amostras aquosas, que, normalmente, ronda os 5µm e, por sua vez, concentrações elevadas.

O óxido de deutério ou água deuterada,  $\text{D}_2\text{O}$ , é muito utilizado a fim de substituir a água na análise por FTIR de amostras aquosas. O percurso ótico pode ser aumentado para 50µm com uma concentração relativamente baixa uma vez que a banda da água é deslocada para valores mais baixos de energia, aproximadamente,  $1210\text{cm}^{-1}$ .<sup>72,93,94</sup>

A técnica de FTIR permite recolher informação ao nível molecular através da análise da região de amida I, amida II, amida III e das vibrações de alongamento N-H, correspondentes às regiões de amida A e B, do espectro de FTIR, figura I.6.<sup>91,93,94</sup>



**Figura I.6:** Espectro ilustrativo de FTIR aplicado a proteínas onde se representam as regiões de Amida A e B ( $3300\text{cm}^{-1}$  a  $2800\text{cm}^{-1}$ ), Amida I ( $1650\text{cm}^{-1}$ ), Amida II ( $1550\text{cm}^{-1}$ ) e Amida III ( $1400\text{cm}^{-1}$  a  $1200\text{cm}^{-1}$ ), adaptado de Miller.<sup>94,96</sup>

As vibrações registadas na região de amida I, a aproximadamente  $1650\text{cm}^{-1}$ , são maioritariamente provenientes da vibração de ligações peptídicas, sendo cerca de 80% referentes às vibrações de alongamento  $\text{C}=\text{O}$  do grupo amida, com uma pequena contribuição da vibração de alongamento  $\text{C}-\text{N}$ .<sup>59,91-93</sup> As estruturas secundárias específicas nas proteínas, folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, hélices- $\alpha$  e *random coil*, estão associadas a padrões particulares de ligações de hidrogénio entre os grupos amida  $\text{C}=\text{O}$  e  $\text{N}-\text{H}$ , que dão origem a bandas de amida I características de cada estrutura na região do espectro compreendida entre  $1600\text{cm}^{-1}$  e  $1700\text{cm}^{-1}$ , figuras I.6 e I.7.<sup>41,42,59,92,93,95,97</sup> Deste modo, as estruturas secundárias de uma proteína dão origem a vibrações com um determinado número de onda específico.<sup>42,91,93</sup>

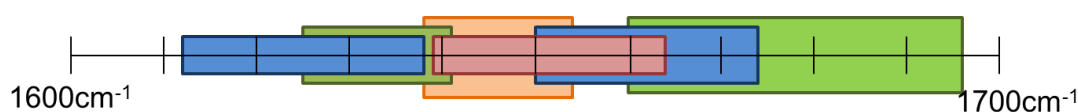
Contudo, como as diferentes vibrações associadas a esta banda de amida I dão origem a números de onda que se encontram muito próximos, torna-se necessário separá-los, decompondo a banda de amida I, através de tratamentos matemáticos, como uma segunda derivada ou uma desconvolução de Fourier.<sup>91,92</sup>

Conseguiu reunir-se um conjunto de dados onde os espectros de proteínas obtidos por diferentes autores possibilitou a realização de uma gama de diferentes valores de energia onde podem ser atribuídas as diferentes estruturas secundárias.<sup>35,39-42,59,72,91,94,95,98,99</sup> O resultado é que uma estrutura secundária particular absorve predominantemente numa gama específica da região amida I, tabela I.6 e figura I.7.<sup>35,39-42,59,72,91,94,95,98,99</sup>



**Tabela I.6:** Atribuição das posições das bandas na região de Amida I para cada estrutura secundária, em D<sub>2</sub>O. <sup>35,39-42,59,72,91,94,95,98,99</sup>

Estrutura secundária	Região do espectro correspondente
	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )
<b>Folhas-β intermoleculares</b>	1612cm <sup>-1</sup> a 1638cm <sup>-1</sup>
	1650cm <sup>-1</sup> a 1674cm <sup>-1</sup>
<b>Folhas-β intramoleculares</b>	1626cm <sup>-1</sup> a 1642cm <sup>-1</sup>
	1660cm <sup>-1</sup> a 1694cm <sup>-1</sup>
<b>Random coil</b>	1638cm <sup>-1</sup> a 1654cm <sup>-1</sup>
<b>Hélices-α</b>	1639cm <sup>-1</sup> a 1664cm <sup>-1</sup>



**Figura I.7:** Diagrama com a atribuição das posições das bandas de Amida I para cada estrutura secundária, em D<sub>2</sub>O. **Legenda:** a azul estão representados os intervalos correspondentes às folhas-β intermoleculares, a verde estão representados os intervalos correspondentes às folhas-β intramoleculares, a cor-de-laranja estão representados os intervalos correspondentes às estruturas *random coil* e a vermelho estão representados os intervalos correspondentes às hélices-α. <sup>35,39-42,59,72,91,94,95,98,99</sup>

A região de amida II, a aproximadamente 1550cm<sup>-1</sup>, é a combinação fora de fase da ligação N-H na curva do plano, aproximadamente 60%, e a vibração de alongamento da ligação C-N, aproximadamente 40%, com pequenas contribuições de C=O no plano dobrado e das vibrações de alongamento C-C e C-N. A vibração de proteínas registadas na região de amida II dificilmente são afetada pelas vibrações da cadeia lateral, contudo, a correlação entre a estrutura secundária e a frequência das proteínas é menos direta do que a vibração que ocorre na região da amida I. Porém, esta região, fornece informações estruturais valiosas que permitem fazer uma predição da estrutura secundária das proteínas. <sup>93,94,100</sup>

A região de absorção de amida III, que varia desde 1400cm<sup>-1</sup> a 1200cm<sup>-1</sup> no espectro de infravermelhos, decorre, predominantemente, de vibrações de alongamento C-N acopladas a vibrações de flexão no plano de N-H, com algumas contribuições, embora fracas, do alongamento C-C e flexões no plano C=O. <sup>93,94</sup> Além disso, muitas vezes o sinal vem também com vibrações CH<sub>2</sub> das cadeias laterais. <sup>93,94</sup> Contudo, as várias vibrações envolvidas entre as proteínas, que contribuem para a região de amida III, tornam esta região vibracional menos eficiente. Deste modo, a caracterização da estrutura proteica através da região da amida III apresenta diversos problemas, uma vez que a natureza exata da informação obtida e a sua relação com a estrutura secundária das proteínas não é, ainda, totalmente compreendida. <sup>93,94</sup>

As vibrações de alongamento da ligação N-H, correspondentes à amida A e B, aparecem a, aproximadamente, 3300cm<sup>-1</sup> e 3070cm<sup>-1</sup> no espectro de FTIR. Mais especificamente é a vibração de alongamento de N-H que dá origem à banda de amida A, entre 3310cm<sup>-1</sup> e 3270cm<sup>-1</sup>. Esta região é exclusivamente restringida ao grupo N-H sendo aplicada em proteínas



insensíveis à conformação do esqueleto do polipéptido e onde a sua frequência depende da força da ligação de hidrogénio. A banda de amida A faz parte de um retículo de ressonância de Fermi (que ocorre quando duas ligações, que vibram em frequências próximas ou semelhantes, produzem bandas de absorção com frequências igualmente próximas dando origem ao acoplamento de vibrações fundamentais) onde o segundo componente, amida B, absorve, pouco, entre  $3100\text{cm}^{-1}$  e  $3030\text{cm}^{-1}$ .<sup>72,93,94</sup>

A banda de amida I de polipeptídeos e proteínas é de todas as bandas de amida, a mais sensível à estrutura secundária das proteínas. De facto, a explicação da diversidade de estruturas de folhas- $\beta$  observadas na banda de amida I tem apresentado um grande desafio, assim como a extensão em que o acoplamento, através das ligações de hidrogénio, influencia a frequência de amida I.<sup>94</sup>

Em suma, a estrutura molecular de proteínas pode ser analisada com sucesso em diversas condições e estados funcionais pela espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier.<sup>40</sup> Essas instâncias incluem a análise de proteínas e péptidos associados a membranas, proteínas grandes e proteínas e péptidos menores que podem existir num equilíbrio rápido. Por outro lado, existem circunstâncias em que a espectroscopia FTIR é talvez apenas um dos muitos métodos disponíveis para caracterização, e a decisão de qual técnica utilizada por um investigador é baseada no problema abordado, familiaridade com a técnica e disponibilidade de instrumentação.<sup>93</sup>

## 5. Proteólise de soro de origem láctea

A proteólise, fenómeno bioquímico complexo, que ocorre durante o processo de maturação de produtos lácteos, maioritariamente de queijos, afeta tanto a textura, como o sabor e o aroma, através da formação de péptidos, aminoácidos e de precursores de compostos voláteis.<sup>101,102</sup>

A proteólise de lacticínios é comumente dividida em duas fases, proteólise primária ou secundária.<sup>101,102</sup>

A proteólise primária, ou hidrólise primária das proteínas, ocorre, principalmente, através da ação da plasmina, na qual há a produção de péptidos longos, insolúveis em água, e péptidos curtos, solúveis em água, que podem, posteriormente, ser degradados. Esta primeira fase da proteólise é medida a partir do quociente entre o azoto solúvel em água (WSN) e o azoto total.<sup>101,102</sup>

A proteólise secundária ocorre devido à ação das proteinases e peptidases da flora microbiana dando origem à degradação dos péptidos em péptidos de cadeia curta e aminoácidos livres. A segunda fase da proteólise pode ser determinada através da relação entre o azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCASN) e o azoto total.<sup>101,102</sup>

De forma a ser possível avaliar o grau da proteólise foram desenvolvidos métodos e técnicas que permitem relacionar o fracionamento do azoto com o tamanho dos péptidos em solução com diversos solventes. Os métodos não específicos da proteólise incluem a determinação do azoto amoniacal ( $\text{NH}_3$ ), do azoto solúvel em água (WSN), do azoto solúvel em

àcidofosfotúngstico (PTASN) e do azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCASN), através do método de Kjeldahl.<sup>101,103</sup>

### 5.1. Azoto amoniacal (NH<sub>3</sub>)

A produção de amoníaco através da desaminação de aminoácidos altera características importantes nos alimentos, como o sabor e a textura, devido à neutralização da acidez, sendo um indicador de proteólise.<sup>104</sup>

### 5.2. Azoto solúvel em água (WSN)

A fração de azoto solúvel em água é constituída por péptidos longos, pequenos e médios, por aminoácidos livres que resultam da ação proteolítica das enzimas coagulantes do leite, proteases endógenas do leite, fermentos lácticos, e flora microbiana.<sup>102,104</sup> No caso do soro de leite, a maioria das proteínas presentes são solúveis em água, e a avaliação deste teor dá-nos mais uma medida da perda de solubilidade das proteínas que pode ocorrer devido a alterações conformacionais ligadas à proteólise, à desnaturação térmica, ou à alteração de outros parâmetros importantes como pH e força iónica.<sup>102,104</sup>

### 5.3. Azoto solúvel em ácido fosfotúngstico (PTASN)

O fracionamento com o ácido fosfotúngstico, a 5%, é o método mais seletivo, sendo constituído apenas pelos aminoácidos e pelos péptidos com um peso molecular inferior a 600Da.<sup>102</sup> O azoto solúvel neste ácido, PTA, é uma medida do conjunto de aminoácidos, que podem ser posteriormente identificados e quantificados, correspondendo assim ao azoto aminoacídico.<sup>104</sup>

### 5.4. Azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCASN)

O azoto solúvel em ácido tricloroacético é medido a 12% de concentração uma vez que diferentes frações de proteínas precipitam a diferentes concentrações deste ácido.<sup>102,104</sup> Com uma concentração de TCA de 12%, todos os péptidos longos e curtos, assim como os aminoácidos são solúveis.<sup>102,104</sup>

## 6. Objetivos

Com este trabalho pretende-se estudar as alterações estruturais das proteínas do soro de leite, nomeadamente da  $\beta$ -Lg, que ocorrem quando o soro de leite é submetido a tratamentos conducentes à diminuição da alergenidade, nomeadamente pré-tratamentos térmicos e químicos e posterior reticulação com transglutaminase.

O consumo do soro de leite, assim como a sua aplicação na indústria alimentar, tem aumentado drasticamente nos últimos anos. O soro de leite deixou de ser visto como um

desperdício na indústria dos laticínios e passou a ser reconhecido pelo seu elevado teor nutricional. A  $\beta$ -lactoglobulina, proteína mais abundante do soro de leite, é responsável pela maioria dos benefícios, tanto nutricionais como a nível da saúde humana, associados ao soro de leite, contudo possui uma capacidade alergénica elevada. Deste modo torna-se essencial divisar uma metodologia para diminuir a capacidade alergénica desta proteína sem necessidade de recorrer à sua extração.<sup>1,21,26</sup>

O estudo do processo de reticulação com vista à redução da alergenidade da  $\beta$ -lactoglobulina, decorreu em três frentes:

- ✓ Reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina pura pela transglutaminase e otimização das condições de pré-tratamento, aquecimento e acerto de pH.
- ✓ Reticulação de proteínas numa mistura de soro de leite comercial *Total Whey*, pela transglutaminase e otimização das condições de pré-tratamento, aquecimento e acerto de pH.
- ✓ Reticulação de proteínas presentes em soro de queijo pela transglutaminase e otimização das condições de pré-tratamento, aquecimento e acerto de pH. Estudaram-se igualmente os efeitos da adição de inibidores e potenciadores da transglutaminase.



## Capítulo II. Métodos Experimentais

### 1. Preparação da $\beta$ -lactoglobulina

A  $\beta$ -lactoglobulina (*Sigma Aldrich*,  $\geq 90\%$ ) foi preparada numa solução de  $D_2O$  (*Sigma Aldrich*) a 5%. A forte absorção do modo de flexão da ligação O-H da molécula de água sobrepõe-se, no espectro de FTIR, com a banda da amida I da proteína, impedido a sua utilização nesta técnica.<sup>40</sup> Desta forma recorreu-se à água deuterada uma vez que permite dissolver as proteínas e visualizar as bandas correspondentes às estruturas secundárias das mesmas.<sup>40,91</sup>

Após a proteína se encontrar na solução aquosa a 5%, são preparadas cinco condições de pré-tratamento:

- i. Sem aquecimento e sem acerto de pH;
- ii. Sem aquecimento e com acerto de pH;
- iii. Com aquecimento e sem acerto de pH;
- iv. Com aquecimento seguido de acerto de pH;
- v. Com acerto de pH seguido de aquecimento.

O aquecimento das amostras é feito num banho a  $80^\circ\text{C}$  (*memmert*), previamente aquecido, durante 1h. As amostras são aquecidas com a finalidade de desnaturar a proteína que apresenta uma estrutura terciária compacta. Deste modo, a transglutaminase consegue aceder aos epítomos alergénicos que, antes do tratamento térmico, se encontravam camuflados pela própria estrutura da proteína.<sup>16,18,25,72,75,78,80,85</sup>

O acerto de pH, a pH 7, é feito por ser o pH ótimo de ação da transglutaminase.<sup>18,72</sup> A solução aquosa da  $\beta$ -lactoglobulina apresenta, na maioria dos casos, um pH superior a 7. Para se atingir o pH desejado é adicionado à amostra uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0.1N (*Scharlau*, 36.5-38% m/m). Para se realizar o acerto de pH foi utilizado o medidor de pH da *Crison* (pH-Meter BASIC 20<sup>+</sup>).

Para cada condição foram tiradas amostras para analisar por FTIR e por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), (pontos 4 e 5, respetivamente). As amostras analisadas na espectroscopia de FTIR foram utilizadas numa concentração a 5%, após um estudo onde se determinou a melhor concentração a utilizar, assim como as amostras resolvidas nos géis de poliacrilamida em SDS foram diluídas para 30mg/mL. A restante amostra foi congelada para os estudos posteriores.

#### 1.1. Adição de transglutaminase à solução de $\beta$ -lactoglobulina

A transglutaminase (*Anjinomoto Activa TI*, 100U de TG/g de mistura) é utilizada para reticular as proteínas alergénicas do soro de leite reduzindo a sua capacidade alergénica.<sup>72</sup>

A fim de otimizar a concentração de TG para a reação de reticulação com a proteína, utilizaram 3 concentrações de TG:

- a. 25U de TG/g de proteína;
- b. 50U de TG/g de proteína;
- c. 100U de TG/g de proteína;
- d. 200U de TG/g de proteína,

às duas condições de pré-tratamento onde se obteve um melhor grau de desnaturação da proteína e onde esperamos obter uma melhor reticulação:

- iv. Com aquecimento seguido de acerto de pH;
- v. Com acerto de pH seguido de aquecimento.

Após a adição da enzima, agitou-se as amostras durante 20 minutos, e seguidamente colocaram-se na estufa (*WTC binder*, 7200) a 50°C durante 14:30h. Posteriormente, colocou-se as amostras num banho de água e gelo a 4°C durante 10 minutos para parar a reação.

Para cada condição foram retiradas amostras para analisar por FTIR e por eletroforese de proteínas em SDS-PAGE (pontos 4 e 5, respetivamente). As amostras analisadas na espectroscopia de FTIR foram utilizadas numa concentração a 5%, após um estudo onde se determinou a melhor concentração a utilizar, assim como as amostras resolvidas nos géis de poliacrilamidade em SDS foram diluídas para 30mg/m. A restante amostra foi congelada para os estudos posteriores.

## 1.2. Estudos cinéticos de reticulação pela transglutaminase

O estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina realizou-se com a melhor condição de pré-tratamento, com aquecimento seguido do acerto de pH (iv), e com a melhor concentração de transglutaminase, 100U de TG/g de proteína (b).

A cinética da reação de reticulação da proteína com a enzima foi de 10h na estufa a 50°C (*WTC binder*, 7200). Retirou-se as amostras de duas em duas horas e colocou-se num banho de água e gelo a 4°C durante 10 minutos para parar a reação.

As amostras foram guardadas para analisar no FTIR e em eletroforese de proteínas em SDS-PAGE (pontos 4 e 5, respetivamente). As amostras analisadas na espectroscopia de FTIR foram utilizadas numa concentração a 5%, após um estudo onde se determinou a melhor concentração a utilizar, assim como as amostras resolvidas nos géis de poliacrilamidade em SDS foram diluídas para 30mg/m. A restante amostra foi congelada para os estudos posteriores.

## 2. Preparação do soro comercial

O soro de leite comercial, ou *whey* comercial (*Total Whey*, com sabor a morango), foi fornecido pela *Gold Nutrition*. É preparada uma mistura de soro comercial e D<sub>2</sub>O a 10%. A mistura é agitada durante 1h até o soro se dissolver por completo. São preparadas cinco condições de pré-tratamento (referidas no ponto 1, i a v).

O aquecimento das amostras é feito num banho (*memmert*) a 80°C, previamente aquecido, durante 1h. As amostras são aquecidas com a finalidade de desnaturar a  $\beta$ -Lg, proteína dominante do soro, que apresenta uma estrutura terciária compacta.

O acerto de pH, a pH 7 (pH ótimo da transglutaminase) é feito uma vez que a mistura de soro comercial a 10% apresenta, na maioria dos casos, um pH inferior a 7. Para se atingir o pH desejado é adicionado à amostra uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0.1N (*JMS, José Manuel Gomes dos Santos, 98,5%*). Para se realizar o acerto de pH foi utilizado o medidor de pH *Crison (micro pH 2001)*.

De cada condição retiraram-se três alíquotas para realizar a determinação das proteínas pelo método de Kuchroo e Fox (ponto 6) e analisar por FTIR e eletroforese de proteínas em SDS-PAGE (ponto 4 e 5, respetivamente). As amostras analisadas na espectroscopia de FTIR foram utilizadas numa concentração a 9%, após um estudo onde se determinou a melhor concentração a utilizar, assim como as amostras resolvidas nos géis de poliacrilamidade em SDS foram diluídas para 30mg/mL. A restante amostra foi congelada para os estudos posteriores.

### 2.1. Adição de transglutaminase ao soro comercial

Numa primeira fase adicionou-se 50U de TG/g de proteína às cinco condições de pré-tratamento do soro comercial indicadas anteriormente. Após a adição de TG as amostras devem ser tapadas para evitar que a enzima reaja com o ar. As amostras são agitadas durante 20 minutos, à temperatura ambiente, para se misturar completamente e iniciar a reação. Posteriormente, as amostras são colocadas na estufa (*WTC binder, 7200*), previamente aquecida a 50°C durante 12h. Seguidamente, as amostras são colocadas num banho de água e gelo a 4°C para parar a reação.

Das alíquotas guardadas foi retirada a amostra em estudo para realizar a análise por FTIR, e eletroforese de proteínas em SDS-PAGE, (pontos 4 e 5, respetivamente). As amostras analisadas na espectroscopia de FTIR foram utilizadas numa concentração a 9%, após um estudo onde se determinou a melhor concentração a utilizar, assim como as amostras resolvidas nos géis de poliacrilamidade em SDS foram diluídas para 30mg/mL. A restante amostra foi congelada para os estudos posteriores.

### 2.2. Estudos cinéticos de reticulação pela transglutaminase

O estudo cinético do soro comercial com a TG foi realizado nas duas melhores condições de pré-tratamento e de concentração de enzima.

Na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento (v), realizou-se uma cinética de 24h onde se foram retirando alíquotas de amostras em diferentes intervalos de tempo. Inicialmente dissolveu-se 50U de TG/g de proteína de soro comercial 10%. A mistura ficou a agitar durante 20 minutos até a enzima se dissolver completamente. Para iniciar a reação de reticulação as amostras foram para a estufa (*WTC binder, 7200*) a 50°C durante o

tempo da cinética. A fim de parar a reação, as alíquotas foram colocadas num banho de água e gelo a 4°C durante 10 minutos.

Das alíquotas foram retiradas amostras para realizar a análise por FTIR, e por eletroforese de proteínas em SDS-PAGE (pontos 4 e 5, respetivamente). A restante amostra foi congelada para os estudos posteriores.

Na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH (iv), a cinética da reação com a transglutaminase realizou-se consoante o procedimento descrito na condição anterior mas neste caso, seguiu-se a cinética ao longo de 10h na presença de 100U de TG/g de proteína.

### 3. Preparação do Soro de Queijo

O soro de queijo foi fornecido pela *Lactovouga – lacticínios e derivados Lda*. Mediu-se o pH (*Crison, micro pH 2001*), fez-se a determinação das proteínas pelo método de Kuchroo e Fox (ponto 7) e analisaram-se no FTIR em eletroforese de proteínas em SDS-PAGE (pontos 4 e 5, respetivamente).

Preparou-se o soro de queijo na condição com aquecimento seguido de acerto de pH (iv). Para tal colocou-se a amostra de soro de queijo num banho de água a 80°C (memmert) durante 1h e posteriormente acertou-se o pH a 7 (*Crison, micro pH 2001*) com a adição de NaOH 0.1N (*JMS, José Manuel Gomes dos Santos, 98,5%*). A amostra foi congelada para análises posteriores.

#### 3.1. Estudos cinéticos de reticulação pela transglutaminase

O estudo cinético da reticulação do soro de queijo pela transglutaminase realizou-se com a condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH (iv) com a adição de 100U de TG/g de proteína. Realizou-se uma cinética de 10h na estufa (*WTC binder, 7200*) a 50°C onde se foram retirando alíquotas de duas em duas horas. Posteriormente colocou-se as alíquotas num banho de água e gelo a 4°C a fim de parar a reação de reticulação.

As alíquotas foram guardadas para analisar no FTIR, e em eletroforese de proteínas em SDS-PAGE (pontos 4 e 5, respetivamente). As amostras analisadas na espectroscopia de FTIR foram utilizadas numa concentração a 1,7%, após um estudo onde se determinou a melhor concentração a utilizar. A restante amostra foi congelada para os estudos posteriores.

#### 3.2. Inibidores e potenciadores da transglutaminase

A transglutaminase, como já foi referido anteriormente, possui diversos potenciadores e inibidores da sua atividade enzimática. A fim de verificarmos em que medida se poderia aumentar o rendimento da reação de reticulação do soro de queijo pela transglutaminase, e de que forma certos enriquecedores do leite (como é o caso do ferro e do cálcio), podem interferir



neste rendimento, realizou-se um estudo em que se selecionaram dois inibidores (cobre e ferro) e dois potenciadores (zinco e cálcio) da enzima.

Prepararam-se quatro amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido do acerto de pH (iv) na presença de 100U de TG/g de proteína. A cada amostra de soro de queijo com TG foram adicionadas as quantidades respetivas de cada ião de modo a perfazer uma concentração final de 5mM ião em solução:

- sulfato de cobre II ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), *Panreac*;
- sulfato de ferro II ( $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), *Riedel-de Haën*;
- sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), *Panreac*;
- sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ), *BDH laboratory reagents*.

Agitou-se a mistura durante 20 minutos até toda a TG ficar dissolvida. Colocou-se a solução na estufa (*WTC binder, 7200*) a 50°C durante 6h. Para parar a reação colocou-se a amostra num banho de água e gelo durante 10 minutos.

De cada solução retirou-se três alíquotas para realizar a determinação das proteínas pelo método de Kuchroo e Fox, azoto solúvel, (ponto 6) e analisar por FTIR e por eletroforese de proteínas em SDS-PAGE (pontos 4 e 5, respetivamente). As amostras analisadas na espectroscopia de FTIR foram utilizadas numa concentração a 1,7%, após um estudo onde se determinou a melhor concentração a utilizar. A restante amostra foi congelada para os estudos posteriores.

#### 4. Estrutura secundária das proteínas do soro determinada por FTIR

A técnica de FTIR aplicada à análise de proteínas, tem vindo a despertar interesse junto da comunidade científica devido a ser uma análise expedita, que necessita de pouca amostra e não é destrutiva (ponto 1 em anexo). Diversos estudos aplicam esta técnica à análise da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina pela transglutaminase.<sup>72,80,105–111</sup>

As amostras, antes de serem analisadas no FTIR, têm de ser liofilizadas para eliminar a água presente na solução. Congelou-se as amostras em azoto líquido e deixou-se a liofilizar durante a noite. Posteriormente, as amostras liofilizadas são dissolvidas em  $\text{D}_2\text{O}$  (*Sigma Aldrich*).

As amostras são medidas no espectrofotómetro de FTIR (*PerkinElmer*) em duas regiões espectrais distintas, 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  e 3100-2800  $\text{cm}^{-1}$ , correspondentes às regiões de amida I e amida A e B, respetivamente. A região de amida I foi escolhida uma vez que, de todas as bandas de amida, é a mais sensível à estrutura secundária das proteínas. Por sua vez a região de amida A e B foi selecionada de forma a verificar os resultados contraditórios obtidos na literatura por Eissa<sup>72</sup>, Howell<sup>112</sup> e Bouraoui<sup>113</sup> que testam a forma como as vibrações de alongamento da ligação N-H permitem verificar alterações na estrutura da proteína. Para tal são pipetados 7  $\mu\text{l}$  de amostra (realizou-se três repetições por amostra), que se colocam entre duas janelas de fluoreto de cálcio ( $\text{CaF}_2$ ), 25x4mm (*Sigma Aldrich*). Por cada medição são

efetuados 4 varrimentos. O branco realizou-se nas mesmas condições com D<sub>2</sub>O (*Sigma Aldrich*) em vez da amostra.

Analizou-se os espectros obtidos, através da média previamente calculada de 3 espectros obtidos experimentalmente, no *software PeakFit versão 4.12* (ponto 1.3 em anexo) que permite fazer a desconvolução das bandas. Deste modo, conseguiu-se fazer a atribuição das estruturas secundárias da proteína em estudo, através do ajuste das bandas com funções *lorentzianas*, e foi calculada a sua área analítica que permitiu determinar as quantidades relativas de cada estrutura secundária.

## 5. Análise por eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A análise de proteínas através da eletroforese em géis de poliacrilamida foi realizada com o *kit da Bio-Rad, Mini – PROTEAN Tetra System*, em géis de resolução a 12% e géis de separação a 5% (tabela 0.1 em anexo).<sup>114</sup>

### 5.1. Preparação das amostras

O marcador de pesos moleculares, *Low Range da Bio-Rad*, foi adicionado a uma mistura de água ultrapura e tampão de amostra (tabela 0.2 em anexo) conforme indicações do fabricante.<sup>115</sup>

As amostras, na sua concentração mais adequada, foram adicionadas a um volume igual de tampão de amostra com e sem  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me) (tabela 0.2 em anexo).

Posteriormente, colocou-se as amostras, assim como o marcador, num banho de água em ebulição durante 10 minutos. Neste passo, as proteínas presentes nas amostras são desnaturadas pelo calor na presença do agente redutor  $\beta$ -Me. Desta forma, o  $\beta$ -Me consegue reduzir as pontes dissulfureto das proteínas transformando a maioria dos aglomerados proteicos em monómeros.<sup>116,117</sup>

Por último, centrifugou-se as amostras (*Centurion Scientific, k3 Series, NORLEQ*) a 12000 rpm durante 2 minutos.

Os géis, após se encontrarem polimerizados, foram colocados no suporte e posteriormente na tina (*Bio-Rad, Mini – PROTEAN Tetra System*) em tampão de corrida 1:10 (tabela 0.2 em anexo). Os poços foram carregados com 5  $\mu$ L de marcador de pesos moleculares e com 10  $\mu$ L de amostra.

Colocaram-se os géis a correr durante 60 minutos a 170 volts.

Após terminar a corrida, os géis foram colocados numa mistura 1:3 de solução corante e solução descorante (tabela 0.2, em anexo) durante 90 minutos. De seguida os géis foram colocados, em intervalos regulares, em solução descorante até se conseguirem ver nitidamente as bandas desejadas.

Por último, colocaram-se os géis numa solução de 1:2 de água e solução descorante para hidratar.

## 6. Determinação da concentração de proteínas no soro

### 6.1. Azoto total

O azoto total determinou-se pelo método Kjeldahl. A um tubo de digestão adicionou-se amostra em estudo, se líquida, um determinado volume, se sólida, uma determinada massa, sem qualquer pré-tratamento, uma percentagem de mistura catalisadora (tabela 0.3 em anexo), alguns regularizadores de ebulição e 10mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (*Chem-Lab*, 95-97% m/m). As amostras foram a digerir no digestor *tecator 2006* a 360°C. Após a digestão (quando esta ficou transparente ou límpida), colocou-se as amostras, e respetivas lavagens do tubo digestor, num balão de 100mL e perpez-se o volume com água ultra pura. De seguida, filtrou-se as amostras, com recurso a papel de filtro Whatman n.º 40 ou equivalente, e reservou-se em frasco de plástico até se proceder à destilação.

Para se proceder à destilação, adicionou-se um determinado volume da amostra digerida num tubo de kjeldahl e perpez-se até 100 mL com água ultrapura. Alcalinizou-se com três gotas de fenoltaleína e NaOH 6N (*JMS, José Manuel Gomes dos Santos*, 98,5% m/m) até a solução ficar cor-de-rosa. Num erlenmayer colocou-se 50mL de ácido bórico (20g/L, *Fisher Chemical*, ≥99% m/m) e 0,5mL de solução indicadora (tabela 0.3 em anexo). Destilou-se a amostra, numa unidade de destilação *KJELTEC SYSTEM 1002 Distilling Unit*, para o erlenmayer, previamente preparado, até a solução ficar verde e atingir os 200mL.

Posteriormente titulou-se com ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 0,02N (*Chem-Lab*, 95-97% m/m) até a amostra ficar roxa.

Calculou-se a percentagem de azoto total, através das seguintes equações:

**Equação II.1:** Azoto total para amostras sólidas.

$$(\%N) = \frac{n \times V_{\text{titulante}} \times 14,01}{1000} \times \frac{100}{V_{\text{destilado}}} \times \frac{100}{m}$$

**Equação II.2:** Azoto total para amostras líquidas.

$$(\%N) = \frac{n \times V_{\text{titulante}} \times 14,01}{1000} \times \frac{100}{V_{\text{destilado}}} \times \frac{100}{V_{\text{amostra}}}$$

Em que  $n$  corresponde à normalidade de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,02N,  $V_{\text{titulante}}$  corresponde ao volume em mL de titulante gasto,  $V_{\text{destilado}}$  corresponde ao volume em mL de digerido utilizado na destilação,  $V_{\text{amostra}}$  corresponde ao volume em mL de amostra utilizada na digestão (em amostras líquidas),  $m$  corresponde à massa de amostra em gramas (em amostras sólidas) e 14,01 corresponde à massa molecular do azoto (g/mol).<sup>21,103</sup>

Por último, e após a determinação do azoto total, determinou-se a quantidade de proteína total na amostra.

**Equação II.3:** Quantidade de proteína total na mistura

$$\text{concentração de proteína(\%)} = \%N \times 6,25$$

A quantidade de azoto total é multiplicada por 6,25 (valor tabelado, IDF 25:2008), uma vez que existe 16% de azoto, em média, por proteína.

**6.2. Avaliação da proteólise**

A fim de se determinar a quantidade de proteínas de pequenas dimensões, de péptidos, de resíduos de aminoácidos e de amoníaco presente nas amostras em estudo, recorreu-se à metodologia adaptada de Kuchroo e Fox.<sup>21,103</sup>

Para tal, centrifugou-se a amostra (ou de soro líquido ou preparada a partir de uma solução a 10% m/v, a analisar durante 45 minutos a 3000g (*Sigma Laboratory centrifuges 4K15C, rotor 12256*) e filtrou-se, com recurso a papel de filtro Whatman n.º 40 ou equivalente, o decantado para frascos de plástico. Do filtrado, sempre em duplicados, analisou-se o azoto amoniacal, o azoto solúvel em água, o azoto solúvel em PTA (ácido fosfotungstico), o azoto solúvel em TCA (ácido tricloroacético) e o azoto total.

**6.2.1. Azoto amoniacal (NH<sub>3</sub>)**

Adicionou-se um determinado volume de amostra em estudo a um tubo de kjeldahl e perpez-se até 100mL com água ultrapura. Alcalinizou-se com três gotas de fenolftaleína e NaOH 6N (*JMS, José Manuel Gomes dos Santos, 98,5%, m/m*) até a solução ficar cor-de-rosa. Num erlenmayer colocou-se 50mL de ácido bórico (*Fisher Chemical, ≥99%, 20g/L*) e 0,5mL de solução indicadora de ácido bórico (tabela 0.3 em anexo). Destilou-se a amostra, numa unidade de destilação *KJELTEC SYSTEM 1002 Distilling Unit*, para o erlenmayer, previamente preparado, até a solução ficar verde e atingir os 200mL.

Posteriormente titulou-se com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,02N (*Chem-Lab, 95-97%, m/m*) até a amostra ficar roxa.

Calculou-se a percentagem de azoto amoniacal nas amostras, através da seguinte equação:

**Equação II.4:** Azoto amoniacal (NH<sub>3</sub>) para amostras líquidas.

$$NH_3 (\%N, m/v) = \frac{n \times V_{\text{titulante}} \times 14,01}{1000} \times \frac{100}{V_{\text{amostra}}}$$

Em que  $n$  corresponde à normalidade de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02N,  $V_{\text{titulante}}$  corresponde ao volume em mL,  $V_{\text{amostra}}$  corresponde ao volume de amostra filtrada em mL e 14,01 corresponde à massa molecular do azoto em g/mol.<sup>21,103</sup> Na determinação da fração amoniacal em amostras

de soro comercial, foi calculado o  $\text{NH}_3$  (%N, m/m), através da multiplicação do valor obtido em m/v pelo fator de diluição do soro comercial (10%):

**Equação II.5:** Azoto amoniacal ( $\text{NH}_3$ ) para amostras sólidas.

$$\text{NH}_3 (\%N, m/m) = \frac{n \times V_{\text{titulante}} \times 14,01}{1000} \times \frac{100}{V_{\text{amostra}}} \times 10$$

### 6.2.2. Azoto solúvel em água (WSN)

Procedeu-se como no ponto 6.1, com as amostras filtradas.

Calculou-se a percentagem de azoto solúvel em água, através da seguinte equação:

**Equação II.6:** Azoto solúvel em água (WSN).

$$\text{WSN} (\%N) = \frac{n \times V_{\text{titulante}} \times 14,01}{1000} \times \frac{100}{V_{\text{destilado}}} \times \frac{100}{V_{\text{amostra}}} \times D$$

Em que  $n$  corresponde à normalidade de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,02N,  $V_{\text{titulante}}$  corresponde ao volume em mL,  $V_{\text{amostra}}$  corresponde ao volume de amostra filtrada em mL que é digerida,  $V_{\text{destilado}}$  corresponde ao volume de digerido utilizado na destilação e 14,01 corresponde à massa molecular do azoto em g/mol.<sup>21,103</sup> O factor D é um factor de diluição. É igual à unidade em amostras líquidas e é igual a 10 em amostras que partiram de soro comercial diluído 10% (m/v).

### 6.2.3. Azoto solúvel em ácido fosfotúngstico (PTASN)

Colocou-se, num balão de 100mL, 10mL da solução em estudo, 7mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  3,95M (*Chem-Lab*, 95-97% m/m), tabela 0.3 em anexo, 3mL de PTA (ácido fosfotúngstico, *Acros Organic*, 82% m/m), tabela 0.3 em anexo. Deixou-se a mistura a 4°C durante a noite. Posteriormente, filtrou-se a mistura, com recurso a papel de filtro Whatman n.º 40 ou equivalente, e colocou-se a digerir e destilar conforme descrito no ponto 6.1.

Calculou-se a percentagem de azoto solúvel em PTA, através da seguinte equação:

**Equação II.7:** Azoto solúvel em ácido fosfotúngstico (PTASN).

$$\text{PTASN} (\%N) = \frac{n \times V_{\text{titulante}} \times 14,01}{1000} \times \frac{100}{V_{\text{destilado}}} \times \frac{100}{V_{\text{amostra}}} \times D$$

Em que  $n$  corresponde à normalidade de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,02N,  $V_{\text{titulante}}$  corresponde ao volume em mL,  $V_{\text{amostra}}$  corresponde ao volume de amostra filtrada em mL que é solubilizada em ácido fosfotúngstico e digerida,  $V_{\text{destilado}}$  corresponde ao volume de digerido utilizado na destilação e 14,01 corresponde à massa molecular do azoto em g/mol.<sup>21,103</sup> O factor D é um factor de

diluição. É igual à unidade em amostras líquidas e é igual a 10 em amostras que partiram de soro comercial diluído 10% (m/v).

#### 6.2.4. Azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCASN)

Num balão de 100mL, adicionou-se 10mL da solução em estudo, 10mL de TCA (ácido tricloroacético, *PanReac AppliChem*), tabela 0.3 em anexo, e deixou-se repousar à temperatura ambiente durante 2h. Filtrou-se a mistura, com recurso a papel de filtro Whatman n.º 40 ou equivalente, e colocou-se a digerir e destilar conforme descrito no ponto 6.1.

Calculou-se a percentagem de azoto solúvel em TCA, através da seguinte equação:

**Equação II.8:** Azoto solúvel em ácido trocloroacético (TCASN).

$$TCASN (\%N) = \frac{n \times V_{titulante} \times 14,01}{1000} \times \frac{100}{V_{destilado}} \times \frac{100}{V_{amostra}} \times D$$

Em que  $n$  corresponde à normalidade de  $H_2SO_4$  0,02N,  $V_{titulante}$  corresponde ao volume em mL,  $V_{amostra}$  corresponde ao volume de amostra filtrada em mL que é solubilizada em ácido fosfotúngstico e digerida,  $V_{destilado}$  corresponde ao volume de digerido utilizado na destilação e 14,01 corresponde à massa molecular do azoto em g/mol.<sup>21,103</sup> O factor  $D$  é um factor de diluição. É igual à unidade em amostras líquidas e é igual a 10 em amostras que partiram de soro comercial diluído 10% (m/v).

## Capítulo III. Resultados e Discussão

### 1. $\beta$ -lactoglobulina

A  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), proteína dominante do soro de leite, é o alérgénio dominante do leite de bovino e do soro.<sup>10-12,16</sup> A proteína, que se apresenta no seu estado nativo numa mistura de monómeros e dímeros, com pesos moleculares de 18kDa e 36kDa, respetivamente, apresenta diversos epítópos alérgénios espalhados por toda a sua estrutura.<sup>12,16,33</sup> O aquecimento e os tratamentos proteolíticos podem remover os epítópos conformacionais presentes na estrutura da proteína, ao provocar perda da estrutura terciária e consequente diminuição da alergenidade.<sup>12,38</sup> A  $\beta$ -Lg apresenta um mecanismo de desdobramento complexo durante a desnaturação.<sup>12</sup>

Durante a desnaturação, as ligações de hidrogénio que estabilizam a estrutura nativa da  $\beta$ -Lg são interrompidas, provocando a redução das hélices- $\alpha$  e das folhas- $\beta$  e promovendo a formação de novos arranjos de folhas- $\beta$  intermoleculares. Estes novos arranjos resultam de ligações de hidrogénio intermoleculares entre a proteína e os agregados. A agregação é formada principalmente por trocas dissulfureto e interações hidrofóbicas.<sup>39,72,80,86</sup>

Os rearranjos provocados durante a desnaturação da  $\beta$ -Lg promovem alterações estruturais que permitem a reticulação enzimática.<sup>39,72,80,86</sup>

As enzimas são sugeridas como agentes de reticulação de proteínas. A transglutaminase, sendo a única enzima aprovada pela União Europeia para efetuar reticulação de proteínas a nível industrial, foi utilizada durante o presente estudo para reticular as proteínas do soro do leite, com vista à diminuição da sua alergenidade.<sup>16,26</sup>

A reticulação enzimática foi investigada para melhorar a funcionalidade da  $\beta$ -Lg e diminuir a sua alergenidade sem ser necessária a sua remoção do soro de leite. Contudo, como a  $\beta$ -Lg apresenta uma estrutura terciária extremamente compacta, a eficiência da reação de reticulação é baixa.<sup>16,26</sup>

De modo a reverter esta condicionante, é necessário aplicar pré-tratamentos à proteína em estudo, como a desnaturação, tornando os locais alvo da enzima disponíveis para que a reação ocorra.<sup>16,75,78,80,86</sup> A desnaturação pode ocorrer química ou termicamente.<sup>72,80</sup>

No presente estudo recorreu-se à desnaturação térmica, onde se sujeita o soro de leite a 80°C durante uma hora, promovendo a dissociação das folhas- $\beta$  intramoleculares na estrutura nativa da proteína, levando à formação de novas folhas- $\beta$  intermoleculares.<sup>39,72,80,86</sup>

A  $\beta$ -lactoglobulina reticulada possui uma estrutura e propriedades funcionais diferentes da proteína no seu estado nativo. A sua solubilidade diminui, a estrutura secundária e terciária são alteradas e o seu peso molecular aumenta devido à formação de agregados e polímeros.<sup>16</sup>

### 1.1. Estudo das diferentes condições de pré-tratamento

O aquecimento da solução de  $\beta$ -lactoglobulina, assim como o acerto de pH, provocam alterações a nível estrutural na proteína.<sup>12,38</sup> O aquecimento promove a desnaturação da proteína tornando possível a reticulação pela transglutaminase.<sup>16,72</sup> O acerto de pH torna-se necessário uma vez que o pH ótimo de ação da enzima, transglutaminase, é 7.<sup>18,72</sup>

Realizou-se um estudo das diferentes condições de pré-tratamento da solução de  $\beta$ -lactoglobulina em D<sub>2</sub>O a 5%:

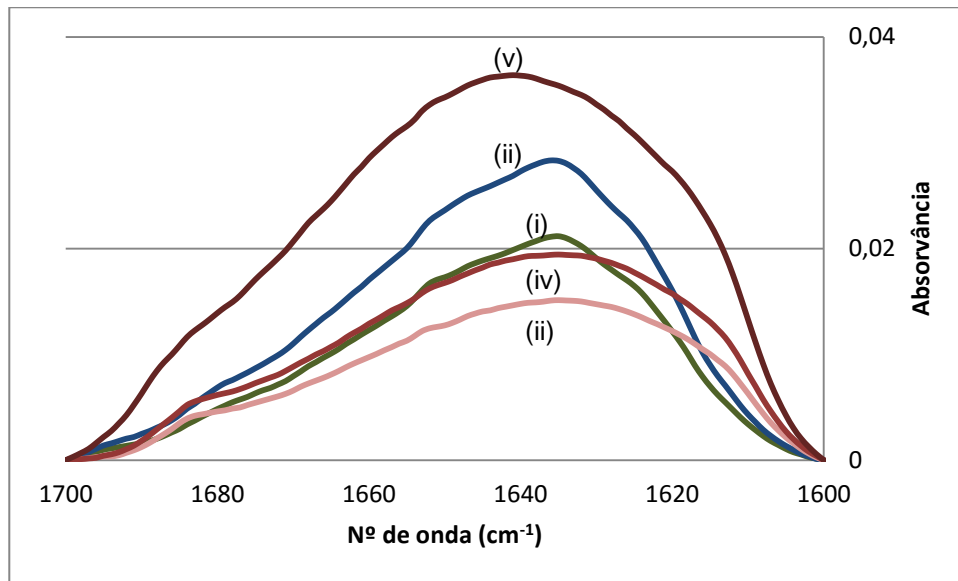
- i. sem aquecimento e sem acerto de pH;
- ii. sem aquecimento e com acerto de pH;
- iii. com aquecimento e sem acerto de pH;
- iv. com aquecimento seguido de acerto de pH;
- v. com acerto de pH seguido de aquecimento;

onde o aquecimento é realizado em banho maria a 80°C durante 1h e o pH é acertado a 7, sendo que o pH inicial da solução de  $\beta$ -lactoglobulina é superior a 7.<sup>18,35,72,80,107,109,110</sup> Com este estudo pretende-se verificar qual das diferentes condições de pré-tratamento é mais favorável para que ocorra maior desnaturação da proteína.

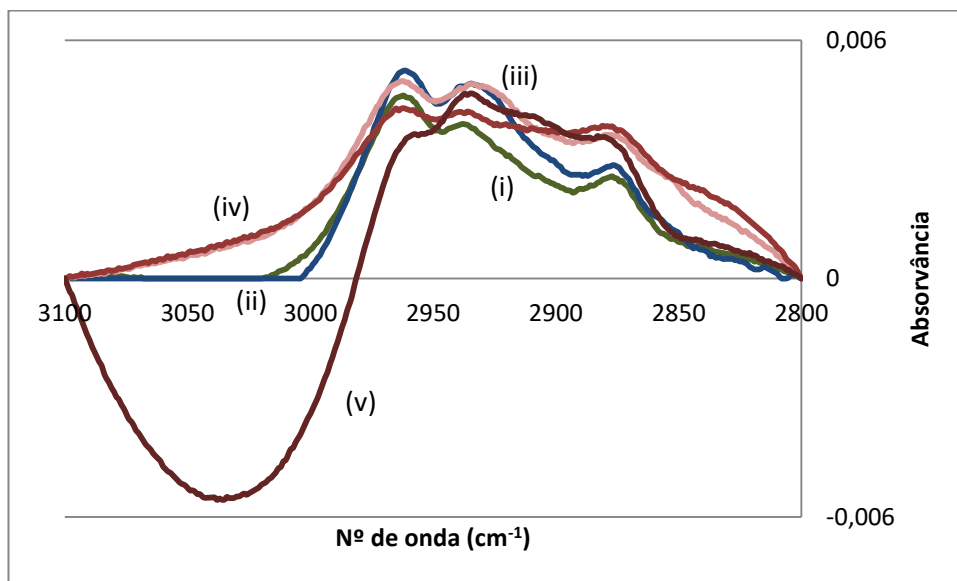
#### 1.1.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

Procedeu-se à análise das diferentes condições pela espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier, FTIR, nas janelas de 1700 a 1600cm<sup>-1</sup> e 3100 a 2800cm<sup>-1</sup>, correspondente à região de amida I (figura III.1) e amida A e B (figura III.2).<sup>16,72,94</sup> A região de amida I é muito utilizada para obter informação sobre as estruturas secundárias da proteína, como as folhas- $\beta$ , hélices- $\alpha$  e *random coil*.<sup>39,72,93,97,98</sup> A região de e vibrações de alongamento N-H, amidas A e B, decorre, predominantemente, da força da ligação de hidrogénio ao azoto (ligação N-H) e das vibrações de alongamento C-N acopladas à vibrações de flexão no plano de N-H.<sup>72,93,94</sup>





**Figura III.1:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas cinco condições de pré-tratamento. **Legenda:** a verde na condição (i) sem aquecimento sem acerto de pH; a azul na condição (ii) sem aquecimento com acerto de pH; a vermelho-claro e na condição (iii) com aquecimento sem acerto de pH; a vermelho na condição (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH; a vermelho-escuro na condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.



**Figura III.2:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas cinco condições de pré-tratamento. **Legenda:** a verde na condição (i) sem aquecimento sem acerto de pH; a azul na condição (ii) sem aquecimento com acerto de pH; a vermelho-claro na condição (iii) com aquecimento sem acerto de pH; a vermelho na condição (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH; a vermelho-escuro na condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Analisando as variações de intensidade dos espectros de FTIR na região de amida I relativos às diferentes condições de pré-tratamento em estudo, verifica-se, no caso da figura III.1, que quando só se faz o aquecimento da amostra (iii), comparando com a condição (i) sem aquecimento sem acerto de pH, verifica-se uma diminuição da intensidade, tendo o espectro o

valor de intensidade mais baixo (a verde na figura III.1). Regista-se ainda um deslocamento do espectro para a direita, isto é, existe uma diminuição dos valores de energia.

No caso em que só se sujeita a amostra ao acerto de pH (ii) e comparando com a condição (i) sem aquecimento e sem acerto de pH (figura III.1), a região amida I do espectro de FTIR sofre também alterações. Verifica-se, que com o acerto de pH, há um ligeiro deslocamento do espectro para a esquerda, há um aumento dos valores de energia, e regista-se um aumento da intensidade do espectro.

Quando se sujeita a amostra à condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguida de acerto de pH verifica-se que há uma diminuição da intensidade, quando comparada com a condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH, e um deslocamento do espectro para a direita, havendo uma diminuição dos valores de energia (figura III.1). Quando se compara a mesma condição (iv) com a condição de pré-tratamento em que só se sujeita amostra ao aquecimento, verifica-se um aumento dos valores de intensidade e um pequeno deslocamento do espectro para valores de energia mais baixos, deslocamento do espectro para a direita (figura III.1).

Quando a amostra é submetida à condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido do aquecimento da amostra verifica-se que há uma aumento da intensidade e uma diminuição dos valores de energia, quando comparado com as cinco condições em estudo (figura III.1).

Analisando agora as diferenças provocadas pelo acerto de pH antes e depois do aquecimento (figura III.1), verifica-se que com o acerto de pH depois do aquecimento não há deslocamento do espectro mas verifica-se uma diminuição da intensidade do mesmo.

Analisando os espectros obtidos na segunda região em estudo, região de amida A e B (figura III.2), não se registam grandes alterações tanto a nível da intensidade como do deslocamento dos espectros. Todos os espectros têm um comportamento semelhante com a exceção do espectro correspondente à condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento. Este apresenta, nos valores de energia mais elevados, valores de intensidade negativo.

#### 1.1.1.1. Região de Amida I

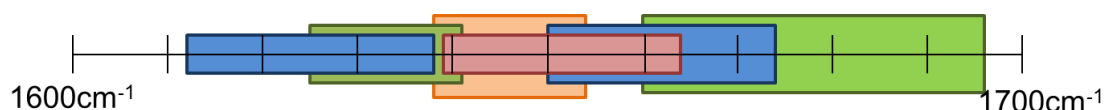
De forma a ser possível fazer uma atribuição adequada de cada estrutura secundária a cada uma das bandas obtidas após a desconvolução, recorreu-se à literatura. Sabe-se que, a aplicação mais comum da espectroscopia de infravermelhos em estudos de proteína é a análise da estrutura secundária. Esta análise é, quase exclusivamente, feita utilizando a banda de amida I, contudo, as bandas de amida II e amida III assim como as bandas de amida A e B também mostraram ser úteis em algumas situações.<sup>94,98,99</sup>

O trabalho já realizado na literatura permitiu reunir um conjunto de dados onde os espectros de proteínas obtidos por diferentes autores, possibilitou a realização de uma gama de diferentes valores de energia onde podem ser atribuídas as diferentes estruturas secundárias.<sup>35,39-42,59,72,91,94,95,98,99</sup> Para além disso, foi já discutido, que a sensibilidade da

banda de amida I à estrutura do esqueleto de proteína é predominantemente devido ao acoplamento de dipolo de transição.<sup>94,98,99</sup> O resultado é que uma estrutura secundária particular absorve predominantemente numa gama específica da região amida I, tabela III.1 e figura III.3.<sup>35,39–42,59,72,91,94,95,98,99</sup>

**Tabela III.1:** Atribuição das posições das bandas na região de Amida I para cada estrutura secundária, em D<sub>2</sub>O.<sup>35,39–42,59,72,91,94,95,98,99</sup>

Estrutura secundária	Região do espectro correspondente
	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )
<b>Folhas-β intermoleculares</b>	1612cm <sup>-1</sup> a 1638cm <sup>-1</sup>
	1650cm <sup>-1</sup> a 1674cm <sup>-1</sup>
<b>Folhas-β intramoleculares</b>	1626cm <sup>-1</sup> a 1642cm <sup>-1</sup>
	1660cm <sup>-1</sup> a 1694cm <sup>-1</sup>
<b><i>Random coil</i></b>	1638cm <sup>-1</sup> a 1654cm <sup>-1</sup>
<b>Hélices-α</b>	1639cm <sup>-1</sup> a 1664cm <sup>-1</sup>



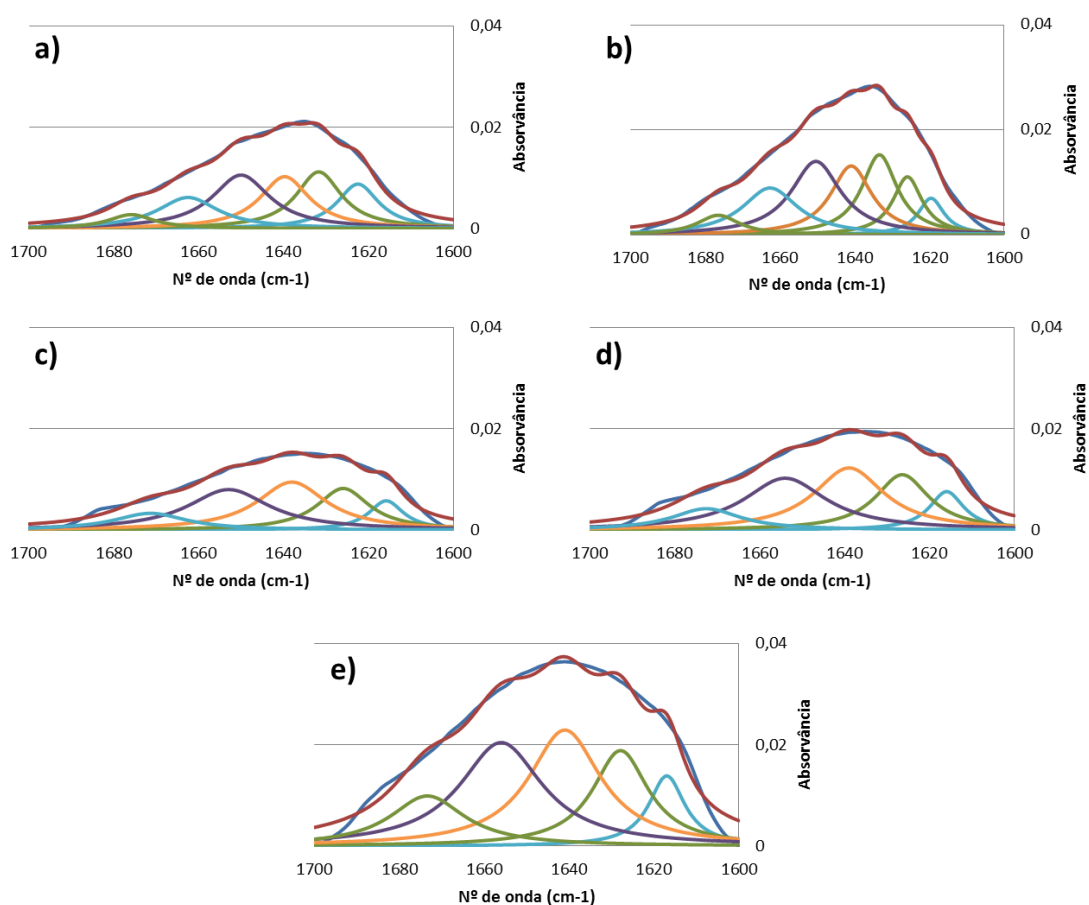
**Figura III.3:** Diagrama com a atribuição das posições das bandas de Amida I para cada estrutura secundária, em D<sub>2</sub>O. **Legenda:** a azul estão representados os intervalos correspondentes às folhas-β intermoleculares (1612cm<sup>-1</sup> a 1638cm<sup>-1</sup> e de 1650cm<sup>-1</sup> a 1674cm<sup>-1</sup>), a verde estão representados os intervalos correspondentes às folhas-β intramoleculares (1626cm<sup>-1</sup> a 1642cm<sup>-1</sup> e de 1660cm<sup>-1</sup> a 1694cm<sup>-1</sup>), a cor-de-laranja estão representados os intervalos correspondentes às estruturas *random coil* (1638cm<sup>-1</sup> a 1654cm<sup>-1</sup>) e a vermelho estão representados os intervalos correspondentes às hélices-α (1639cm<sup>-1</sup> a 1664cm<sup>-1</sup>).<sup>35,39–42,59,72,91,94,95,98,99</sup>

As abordagens mais comuns para determinar a estrutura secundária consistem na montagem da banda de amida I depois de identificar a sua posição recorrendo a técnicas de estreitamento de banda e, recorrendo à decomposição da banda de amida I em espectros de base que são calculados a partir de um conjunto de espectros de calibração de proteínas com estrutura conhecida.<sup>94,98,99</sup>

Estudos previamente realizados<sup>72,97</sup>, indicam que o aquecimento de proteínas provoca alterações significativas, e detetáveis, na região amida I do espectro de FTIR. O aquecimento, ao provocar a quebra das estruturas secundárias e, consequentemente, a perda da estrutura nativa, está na base da desnaturação da proteína. Estas alterações provocam a diminuição da influência das hélices-α<sup>72</sup>, aumento das *random coil*<sup>40,72,95,97</sup> e, mais importante, o aumento da influência das folhas-β intermoleculares.<sup>39,42,72,91,95,97,106</sup> Estas alterações na influência das estruturas secundárias acontece uma vez que as estruturas desnaturadas pelo calor rearranjam-se e estabelecem ligações diferentes das que se observavam antes do aquecimento, formando agregados.<sup>39,72,91,95</sup> A desnaturação provoca ainda a diminuição da

influência das folhas- $\beta$  intramoleculares uma vez que, ao agregarem entre si, as proteínas quebram as suas ligações intramoleculares.<sup>39,42,72,91,95,97,106</sup>

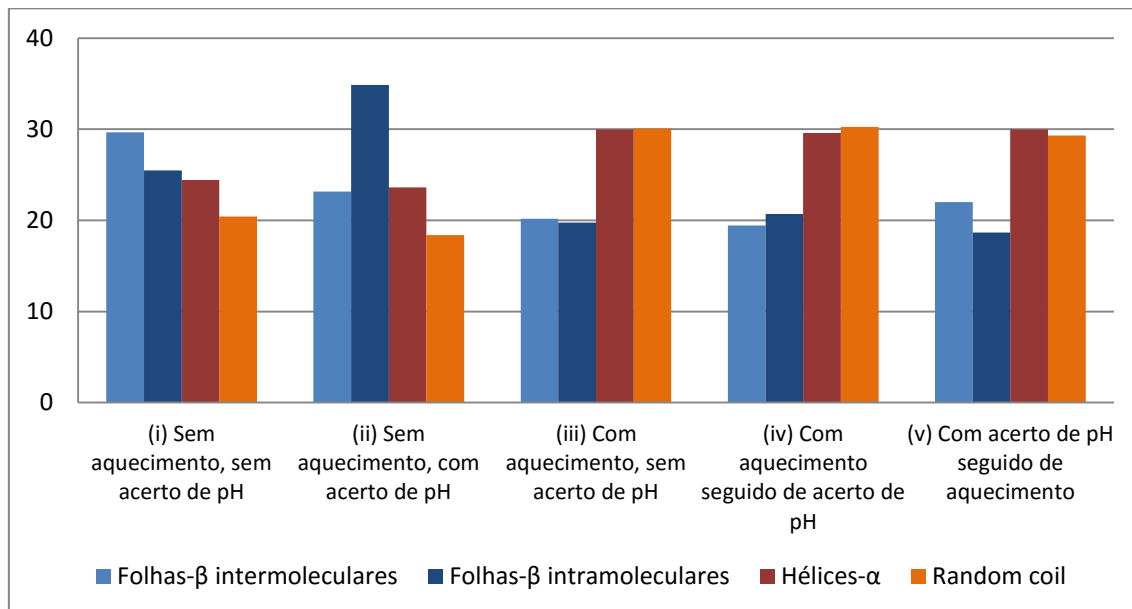
De forma a ser possível analisar as alterações a nível estrutural provocadas pelo aquecimento e o acerto de pH nas diferentes condições de pré-tratamento, recorreu-se à desconvolução dos espectros de FTIR pelo programa *PeakFit v4.12*, onde se subtraiu a linha de base dos espectros e se procedeu à análise espectral através da soma de bandas Lorentzianas. Estas foram inseridas manualmente, e posteriormente ajustadas, com base na pesquisa realizada por Eissa<sup>72</sup> (figura III.4).



**Figura III.4:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas cinco condições de pré-tratamento. **a)** Sem aquecimento sem acerto de pH (i). **b)** Sem aquecimento com acerto de pH (ii). **c)** Com aquecimento sem acerto de pH (iii). **d)** Com aquecimento seguido do acerto de pH (iv). **e)** Com acerto de pH seguido de aquecimento (v). **Legenda:** a azul-escuro é o espectro observado; a vermelho é o espectro desconvoluido; a azul ciano encontram-se as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intermoleculares; a verde as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intramoleculares; a cor-de-laranja a banda correspondente às estruturas *random coil*; a roxo a banda correspondente às hélices- $\alpha$ .

Após a desconvolução dos espectros de FTIR, obtiveram-se diferentes bandas correspondentes às diferentes estruturas secundárias presentes na amostra de  $\beta$ -lactoglobulina em D<sub>2</sub>O a 5%, folhas- $\beta$  intermoleculares, folhas- $\beta$  intramoleculares, hélices- $\alpha$  e *random coil*, que foram atribuídas segundo os resultados obtidos e mostrados na tabela III.1 e figura III.3. Ainda como resultado da desconvolução dos espectros obteve-se a área relativa, em

percentagem de cada uma das bandas. Assumindo que a absorção das bandas de FTIR seguem a Lei de Lambert-Beer e portanto é proporcional à concentração da espécie correspondente, é possível inferir a importância relativa de cada estrutura secundária no espectro total da proteína (figura III.5 e tabelas 0.4 a 0.8 em anexo).<sup>94</sup>



**Figura III.5:** Somatório das percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas diferentes condições de pré-tratamento.

#### 1.1.1.1.1. Efeito do aquecimento nas condições de pré-tratamento

De forma a verificar as alterações provocadas pelo aquecimento na estrutura da  $\beta$ -lactoglobulina na janela de  $1700$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  compararam-se as diferentes condições de pré-tratamento sujeitas a esta alteração. Numa primeira observação, comprando os espectros (a) (c) e (e) da figura III.4, nota-se uma alteração na região da amida I no espectro do FTIR (tabelas 0.6 e 0.8 em anexo).<sup>72</sup> Há alterações na banda correspondente às folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1663\text{ cm}^{-1}$ , e o desaparecimento da banda a  $1675\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde às folhas- $\beta$  intramoleculares e onde pode haver alguma influência de estruturas desordenadas. Surge então, com o aquecimento, uma banda correspondente às folhas- $\beta$  intermoleculares na gama de  $1660\text{ cm}^{-1}$  a  $1694\text{ cm}^{-1}$ .<sup>39,72,93,97</sup> O aparecimento da banda correspondente às folhas- $\beta$  intermoleculares ocorre devido ao rearranjo da estrutura nativa da proteína que resultam de ligações de hidrogénio intermoleculares entre a proteína e os agregados proteicos formadas após a exposição a temperaturas elevadas,  $80^\circ\text{C}$ .<sup>39,72,80,86</sup>

Comparando a condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento e sem acerto de pH, figura III.4 (a), com a condição (iii) com aquecimento sem acerto de pH, figura III.4 (c), verifica-se que, com o aquecimento existe uma diminuição das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1619\text{ cm}^{-1}$  e a  $1668\text{ cm}^{-1}$ , respetivamente, e das folhas-  $\beta$  intramoleculares, a  $1629\text{ cm}^{-1}$ . Verifica-se também

um aumento da influência das hélices- $\alpha$ , a  $1653\text{cm}^{-1}$ , das *random coil*, a  $1640\text{cm}^{-1}$  e o desaparecimento da banda a  $1675\text{cm}^{-1}$  correspondente às folhas- $\beta$  intramoleculares. (tabelas 0.4 e 0.6 em anexo)

Relativamente às condições de pré-tratamento (iii) com aquecimento e sem acerto de pH (figura III.4 (c)) e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento (figura III.4 (e)), verifica-se que com o acerto de pH há uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, a  $1617\text{cm}^{-1}$  e  $1628\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, e das estruturas *random coil*, a  $1641\text{cm}^{-1}$ . Há também um aumento da influência das folhas- $\beta$  intramoleculares, a  $1674\text{cm}^{-1}$ , e verifica-se que não há alterações na influência das hélices- $\alpha$ , a  $1656\text{cm}^{-1}$ . É de notar quando se acerta o pH da amostra há uma redução da desnaturação, uma vez que a influência das folhas- $\beta$  intermoleculares, indicadores de desnaturação, diminui quando comparada com a amostra onde se submete a amostra apenas ao aquecimento.<sup>39,72,91,93,95,97,98</sup> (tabela 0.6 e 0.8 em anexo)

Quando se comparam as condições (iii) com aquecimento sem acerto de pH (figura III.4 (c)) e com (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH (figura III.4 (d)), e analisando as alterações provocadas a nível estrutural verifica-se que, com o acerto de pH, há um ligeiro aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, a  $1619\text{cm}^{-1}$  e  $1629\text{cm}^{-1}$ , respetivamente. Há uma diminuição das estruturas *random coil*, a  $1641\text{cm}^{-1}$ , das hélices- $\alpha$ , a  $1653\text{cm}^{-1}$  e das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1669\text{cm}^{-1}$ . (tabela 0.6 e 0.7 em anexo)

Realizou-se também o somatório das áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  intermoleculares e das folhas- $\beta$  intramoleculares, e analisou-se em conjunto com as áreas analíticas relativas das hélices- $\alpha$  e das *random coil*, figura III.

Na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH (figura III.4 (c)), nota-se que há desnaturação proteica, uma vez que o somatório da percentagem das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares é superior ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares e, regista-se ainda, um aumento da área analítica da estrutura *random coil*, quando comparada com a condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento e sem acerto de pH (figura III.4 (a)), figura III.5 e tabelas 0.4 e 0.6 em anexo.<sup>39,72,91,93,95,97,98</sup> Ao ocorrer a desnaturação da proteína ocorre o rearranjo da estrutura e a formação de agregados proteicos que se ligam através da formação de pontes de hidrogénio entre as diferentes moléculas de  $\beta$ -Lg em solução, estas ligações promovem a formação de folhas- $\beta$  intermoleculares.<sup>39,72,80,86</sup>

Nas condições de pré-tratamento (iii, iv, v) com aquecimento, figura III.4 (c), (d) e (e), verifica-se que há um aumento da influência das estruturas *random coil*, formadas pelo aquecimento uma vez que, quando se sujeita a proteína a temperaturas superiores a  $70^{\circ}\text{C}$ , ocorre a dissociação da sua estrutura terciária levando à formação de estruturas desordenadas, que comprovam que houve desnaturação proteica, figura III.5 e tabelas 0.6 a 0.8 em anexo.<sup>39,42,59,97</sup> Contudo, quando se faz o acerto de pH depois do aquecimento (iv), figura III.4 (d), verifica-se que o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares é superior ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares, figura III.5 e tabela

0.7 em anexo, o que corrobora as conclusões anteriores que indicam que o pH reduz a desnaturação provocada pelo aquecimento.<sup>39,72,91,93,95,97,98</sup>

#### 1.1.1.1.2. Efeito do pH nas condições de pré-tratamento

Analisando as diferenças causadas pelo acerto do pH, no caso em que só se sujeita a amostra ao acerto de pH, figura III.4 (b), e comparando com a condição (i) sem aquecimento e sem acerto de pH (figura III.4 (a)), a região amida I do espectro de FTIR sofre alterações. Há o aparecimento de uma banda, a  $1626\text{cm}^{-1}$ , correspondente às folhas- $\beta$  intramoleculares.<sup>39,93</sup> Com o acerto de pH verifica-se uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1619\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intramoleculares, a  $1633\text{cm}^{-1}$ , das *random coil*, a  $1641\text{cm}^{-1}$ , e das hélices- $\alpha$ , a  $1650\text{cm}^{-1}$ . Há ainda um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, a  $1663\text{cm}^{-1}$  e  $1676\text{cm}^{-1}$ , respetivamente. (tabelas 0.4 e 0.5 em anexo)

Examinando as diferenças entre as condições de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH (figura III.4 (b)) e (iv) com acerto de pH seguido de aquecimento (figura III.4 (d)), relativamente às estruturas secundárias da proteína, averigua-se que, com o aquecimento da amostra, há um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1617\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intramoleculares, a  $1628\text{cm}^{-1}$ , e das hélices- $\alpha$ , a  $1656\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se também, uma diminuição da influência das estruturas *random coil*, a  $1641\text{cm}^{-1}$ , e das folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas, a  $1674\text{cm}^{-1}$ . Observa-se ainda, que com o aquecimento, há o desaparecimento de duas bandas a  $1633\text{cm}^{-1}$  e  $1676\text{cm}^{-1}$ , correspondentes a folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas e antiparalelas, respetivamente. (tabelas 0.5 e 0.7 em anexo)

Analisando agora as diferenças provocadas pelo acerto de pH antes e depois do aquecimento (figura 4 (d) e (e)), regista-se que, com o acerto de pH depois do aquecimento, há um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, a  $1619\text{cm}^{-1}$  e  $1629\text{cm}^{-1}$ , respetivamente. Regista-se também uma diminuição das estruturas *random coil*, a  $1641\text{cm}^{-1}$ , das hélices- $\alpha$ , a  $1653\text{cm}^{-1}$ , e das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1669\text{cm}^{-1}$ . (tabelas 0.7 e 0.8 em anexo)

Recorrendo ao somatório das áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  intermoleculares e das folhas- $\beta$  intramoleculares, e analisando em conjunto com as áreas analíticas relativas das hélices- $\alpha$  e das *random coil*, figura III.5, analisou-se o efeito da desnaturação térmica na presença do acerto de pH nas diferentes condições de pré-tratamento em estudo.

Comparando a condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento seguida de acerto de pH (figura III.4 (b)) com a condição de pré tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento (figura III.4 (e)), verifica-se que há um aumento da influência das *random coil*, o que indica que há alguma desnaturação causada pelo aquecimento,<sup>39,42,59,97</sup> figura III.5 e tabelas 0.5 e 0.8 em anexo. Porém o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares é inferior ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares, na condição (ii) sem aquecimento com acerto de pH, o que indica que o acerto de pH diminui o efeito de desnaturação provocada pelo aquecimento, figura III.5 e tabela 0.5 em anexo.<sup>39,72,91,93,95,97,98</sup>



Nas condições de pré-tratamento em que não se faz o aquecimento da amostra (i e ii), figuras III.4 (a) e (b), verifica-se que quando se faz o acerto de pH há uma diminuição da influência das hélices- $\alpha$  (figura III.5, e tabelas 0.4 e 0.5 em anexo), o que poderia indicar que ocorre desnaturação proteica.<sup>59,72,95</sup> Contudo, quando se compara o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares com o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares (em que, na condição (ii) sem aquecimento com acerto de pH, figura III.4 (b), o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares é maior do que o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares, figura III.5 e tabela 0.5 em anexo), verifica-se que, de facto, o pH pode provocar alguma desnaturação mas não é significativa. Isto pode acontecer devido ao pH da proteína em D<sub>2</sub>O ser superior a 7, e quando se faz o acerto do pH estamos a reduzi-lo para 7, adicionando NaOH.<sup>39,72,91,93,95,97,98</sup>

Por outro lado, quando se faz o acerto de pH antes do aquecimento (v), figura III.4 (e), o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares é inferior ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares, o que corrobora as conclusões anteriores que indicam que há desnaturação proteica.<sup>39,40,42,59,72,95,97</sup> Por outro lado, quando se compara com a condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento e sem acerto de pH (figura III.4 (a)), verifica-se que há uma diminuição da influência destas estruturas secundárias, figura III.5 e tabelas 0.4 e 0.8 em anexo, o que vem suportar a conclusão de que, quando a amostra se encontra a um pH neutro, a desnaturação provocada pelo aquecimento é inferior à desnaturação de uma amostra de proteína a pH superior a 7.<sup>39,40,91</sup>

Quando se acerta o pH depois do aquecimento (iv), figura III.4 (d), a atenuação da desnaturação é muito superior à atenuação verificada na condição em que se acerta o pH antes do aquecimento (v), figura III.4 (e), uma vez que há um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares, indicativas de desnaturação proteica, e uma diminuição das folhas- $\beta$  intramoleculares.<sup>39,72,91,93,95,97,98</sup> (tabelas 0.7 e 0.8 em anexo) Apesar de apresentarem uma menor quantidade de folhas- $\beta$  e uma maior quantidade de hélices- $\alpha$  quando comparadas com a condição onde se sujeitou a amostra apenas ao tratamento térmico (iii), o acerto de pH para um pH neutro é necessário uma vez que é o pH ótimo para que a reação de reticulação ocorra.<sup>18,35,72,80,107,109,110</sup>

Em suma, a melhor condição de pré-tratamento é a condição em que se faz o acerto de pH antes do aquecimento (v), figura III.4 (e).<sup>39,72,91,93,95,97,98</sup>

#### 1.1.1.2. Região de Amida A e B

Na pesquisa literária que se realizou para o presente estudo, pouca foi a informação encontrada sobre a análise do efeito da desnaturação pelo calor da  $\beta$ -lactoglobulina através da espectroscopia de infravermelhos, FTIR, na janela de 3100 a 2800 cm<sup>-1</sup> correspondente à região de amida A e B, figura III.2 (figura 2 e tabelas 0.9 a 0.13 em anexo).<sup>72,93,98</sup>

Segundo Eissa<sup>72</sup>, na janela de 3100 a 2800 cm<sup>-1</sup> do espectro de FTIR, não se verificam alterações consideráveis do espectro após o aquecimento, tanto ao nível do deslocamento das bandas na gama de energia como às suas áreas relativas. Esta conclusão é corroborada por



Howell<sup>112</sup> que mostra ainda que, após o aquecimento, há um aumento da área da banda a  $2940\text{cm}^{-1}$ , embora estes autores tenham usado maiores concentrações de proteína (15 % e 7%) e também maiores temperaturas de aquecimento ( $80^{\circ}\text{C}$  e  $90^{\circ}\text{C}$ ). Porém, Bouraoui.<sup>113</sup> observou exatamente o contrário, ou seja, que há uma diminuição da área dessa mesma banda. Assim, Eissa<sup>72</sup> concluíram que este assunto é ainda controverso e que é possível que esta banda, a  $2940\text{cm}^{-1}$ , não seja apenas função da desnaturação proteica, mas que seja afetada por outras interações da proteína. Contudo, no caso de estudo apresentado, nunca surge esta banda a  $2940\text{cm}^{-1}$ .

Relativamente às alterações provocadas pelo acerto do pH, estes autores, não fazem qualquer tipo de referência.

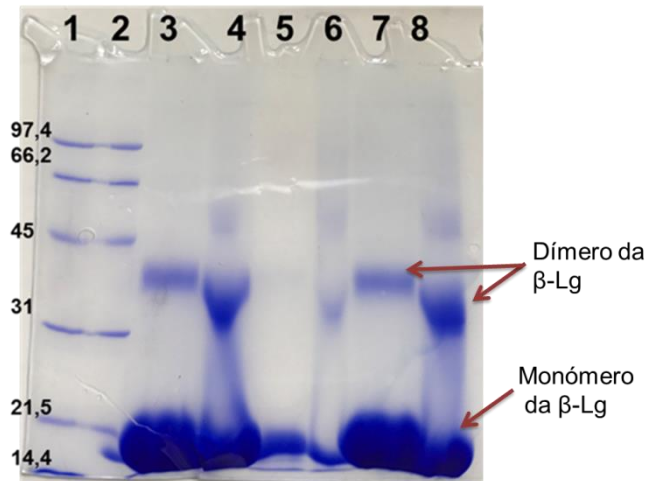
Após uma análise dos espectros obtidos nas 5 condições de pré-tratamento, figura III.2, (figura 2 e tabelas 0.9 a 0.13 em anexo) não se verificou consistência quer na deslocação quer no valor das áreas relativas, ou seja, não há um comportamento tendência e, portanto, não se conseguiu fazer uma generalização ou chegar a uma conclusão específica.

### 1.1.2. Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

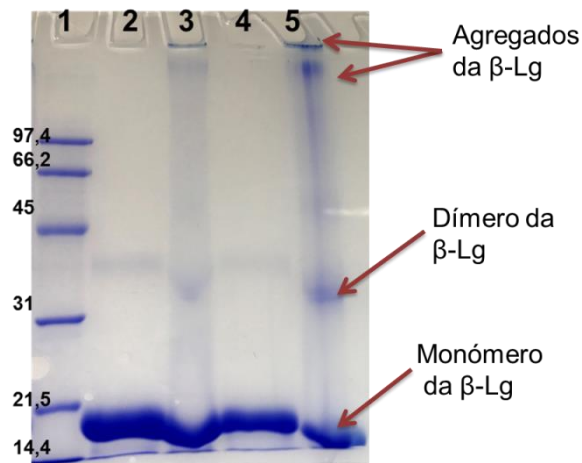
A fim de complementar e suportar as conclusões anteriores, procedeu-se à análise da mesma solução de proteína, nas cinco condições de pré-tratamento, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, SDS-PAGE, figuras III.6 e III.7.

As amostras foram preparadas com e sem a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me). Este agente redutor causa a redução das pontes dissulfureto que são responsáveis pela estrutura nativa da proteína, assim, ocorre a destruição das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas.<sup>116,117</sup>

Ao apresentar estas características, o  $\beta$ -Me, é utilizado em análises de proteínas, como é o caso da eletroforese em géis de poliacrilamida, em que é necessário garantir a presença de moléculas proteicas monoméricas em vez de dímeros, tetrâmeros ou oligómeros de ordem superiores, que sejam ligados através de pontes dissulfureto. Para além disso, o seu grupo hidroxilo concede solubilidade em água às proteínas.<sup>116,117</sup>



**Figura III.6:** Gel de poliacrilamida a 12% com três condições de pré-tratamento da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 30 mg/mL. **Poço 1 e 2:** marcador de pesos moleculares *Low Range* da *Bio-Rad*. **Poço 3:**  $\beta$ -Lg na condição (i) sem aquecimento sem acerto de pH com  $\beta$ -mercaptoetanol. **Poço 4:**  $\beta$ -Lg na condição (i) sem aquecimento sem acerto de pH sem  $\beta$ -mercaptoetanol. **Poço 5:**  $\beta$ -Lg na condição (iii) com aquecimento sem acerto de pH com  $\beta$ -mercaptoetanol. **Poço 6:**  $\beta$ -Lg na condição (iii) com aquecimento sem acerto de pH sem  $\beta$ -mercaptoetanol. **Poço 7:**  $\beta$ -Lg na condição (ii) sem aquecimento com acerto de pH com  $\beta$ -mercaptoetanol. **Poço 8:**  $\beta$ -Lg na condição (ii) sem aquecimento com acerto de pH sem  $\beta$ -mercaptoetanol.



**Figura III.7:** Gel de poliacrilamida a 12% com duas condições de pré-tratamento da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 30 mg/mL. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares *Low Range* da *Bio-Rad*. **Poço 2:**  $\beta$ -Lg na condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com  $\beta$ -mercaptoetanol. **Poço 3:**  $\beta$ -Lg na condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento de pH sem  $\beta$ -mercaptoetanol. **Poço 4:**  $\beta$ -Lg na condição (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com  $\beta$ -mercaptoetanol. **Poço 5:**  $\beta$ -Lg na condição (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH sem  $\beta$ -mercaptoetanol.

Em todas as amostras se vê a banda correspondente ao monómero da  $\beta$ -lactoglobulina a 18,4kDa<sup>33,73,108,109,116</sup> (figura III.6 e III.7). Nas amostras que não foram sujeitas ao aquecimento (figura III.6, poços 3,4,7 e 8) as bandas do monómero são muito mais intensas do que nas restantes (figura III.6 e III.7). O facto da banda correspondente ao monómero apresentar uma intensidade mais baixa nas amostras sujeitas ao aquecimento térmico indica que houve desnaturação da proteína.<sup>73,108</sup> Nestas mesmas amostras (figura III.6, poços 3,4,7 e 8), verifica-se também a existência de uma banda a 36,8kDa<sup>73,109</sup>, correspondente ao dímero da proteína.

Nas amostras em que só se fez o aquecimento (figura III.6, poços 5 e 6), não existe a presença da banda correspondente ao dímero da proteína e a banda correspondente ao monómero, 18,4kDa<sup>33,73,108,109,116</sup>, é a menos intensa de todas as amostras (figura III.6 e III.7), que vem corroborar a conclusão anterior que nos indica que com o aquecimento existe desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina.<sup>73,108</sup>

Comparando as amostras em que se faz o acerto de pH e o aquecimento, figura III.7, verifica-se que na amostra em que se acerta o pH antes (poços 2 e 3) as bandas correspondentes ao monómero da proteína (18,4kDa<sup>33,73,108,109,116</sup>) apresenta uma intensidade superior às bandas das amostras correspondentes à condição de pré-tratamento em que se acerta o pH depois do aquecimento. Isto indica que, na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH a desnaturação proteica é mais acentuada.<sup>73,108</sup>

Em todas as amostras em que não se adicionou  $\beta$ -Me (figura III.6, poços 4, 6 e 8; figura III.7, poços 3 e 5) existe arrastamento da amostra por toda a corrida, que corresponde há existência de agregados proteicos de pesos moleculares intermédios, e há uma banda, a aproximadamente 36,8kDa, que corresponde ao dímero da  $\beta$ -Lg.<sup>73,109</sup> Nos poços 3 e 5 da figura III.7, correspondentes às amostras que foram sujeitas ao aquecimento e acerto de pH, verifica-se a existência de amostra retida nos poços, que nem se quer entraram no gel, e uma banda próxima do poço, mais intensa na amostra da condição com aquecimento seguida do acerto de pH (figura III.7, poço 5), o que mais uma vez nos indica a existência de desnaturação proteica. Devido ao facto da proteína se encontrar desnaturada, há a formação de agregados proteicos com um peso molecular elevado.<sup>73,108</sup>

O aparecimento dos agregados proteicos e dos dímeros em todas as amostras que não foram sujeitas ao poder redutor do  $\beta$ -Me acontece porque não houve a quebra das pontes dissulfureto responsáveis pela formação dos dímeros e agregados da  $\beta$ -lactoglobulina.<sup>116,117</sup>

Em suma, o aquecimento provoca a desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina, observado pela diminuição das bandas correspondentes aos monómeros e aos dímeros da proteína e ao aparecimento de uma banda no topo do gel correspondente aos agregados proteicos.<sup>39,72,80,86</sup> Estes agregados são formados pelo rearranjo das estruturas das proteínas em solução após o aquecimento da amostra.<sup>39,72,80,86</sup> As melhores condições de pré-tratamento, que contém o pH necessário à ação da TG, são as condições a que se sujeita a amostra ao aquecimento e ao acerto de pH:

- iv. com aquecimento seguido de acerto de pH;
- v. com acerto de pH seguido de aquecimento.

## **1.2. Otimização da concentração de transglutaminase para reticulação nas melhores condições de pré-tratamento**

O objetivo principal do presente estudo, consiste na redução da alergenicidade do soro de leite através da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina pela transglutaminase. A TG catalisa a formação de ligações isopeptídicas entre os resíduos de aminoácidos de lisina e glutamina da  $\beta$ -Lg o que leva a que os epítomos alergénicos fiquem “escondidos” no interior da estrutura

polimérica formada e assim, indisponíveis para reagir com o sistema imunitário e desencadear a resposta alérgica.<sup>16,75,78,80,86</sup> Como a  $\beta$ -lactoglobulina tem uma estrutura tridimensional compacta, é necessário desnaturá-la previamente, de forma a expor os referidos aminoácidos, o que pode ser conseguido por meio de aquecimento, sendo 80 °C a temperatura óptima para esse processo.<sup>72,80</sup>

Para se conseguir atingir este objetivo é necessário otimizar as condições de estudo.

No capítulo anterior foram selecionadas as duas melhores condições de pré-tratamento:

- iv. com aquecimento seguido de acerto de pH;
- v. com acerto de pH seguido de aquecimento;

e neste capítulo pretende-se otimizar a quantidade de transglutaminase a utilizar. Para tal realizou-se um estudo em que prepararam quatro soluções de  $\beta$ -lactoglobulina a 5%, nas duas melhores condições de pré-tratamento, em D<sub>2</sub>O com 25U, 50U, 100U e 200U de TG/g de proteína que foram à estufa a 50°C durante a noite.

Quando se adiciona a TG à solução de proteína no seu estado nativo, as ligações formadas com a cadeia central da proteína são reduzidas refletindo-se em pequenas alterações nos espectros da região de amida I.<sup>72</sup> Contudo, a presença da TG provoca alterações no microambiente que rodeia a  $\beta$ -Lg e mais especificamente no grupo carbonilo da cadeia lateral da glutamina que reage com a lisina.<sup>72</sup> Isto é, a TG potencia a formação de ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina que, no caso dos aminoácidos de lisina e glutamina serem na mesma molécula ou em moléculas diferentes, podem ser intermoleculares ou intramoleculares, respetivamente.<sup>72,106,107</sup> Deste modo os átomos de hidrogénio, dentro da mesma proteína ou entre proteínas diferentes, ficam mais próximos sendo possível a formação de novas ligações de hidrogénio, também elas intramoleculares ou intermoleculares.<sup>72,106,107</sup>

Assim, há a formação de polímeros de proteína reticulada, devido aos rearranjos estruturais provocados pela ação da TG, e consequentemente há um aumento das folhas- $\beta$ , tanto intermoleculares como intramoleculares.<sup>72,106,107</sup>

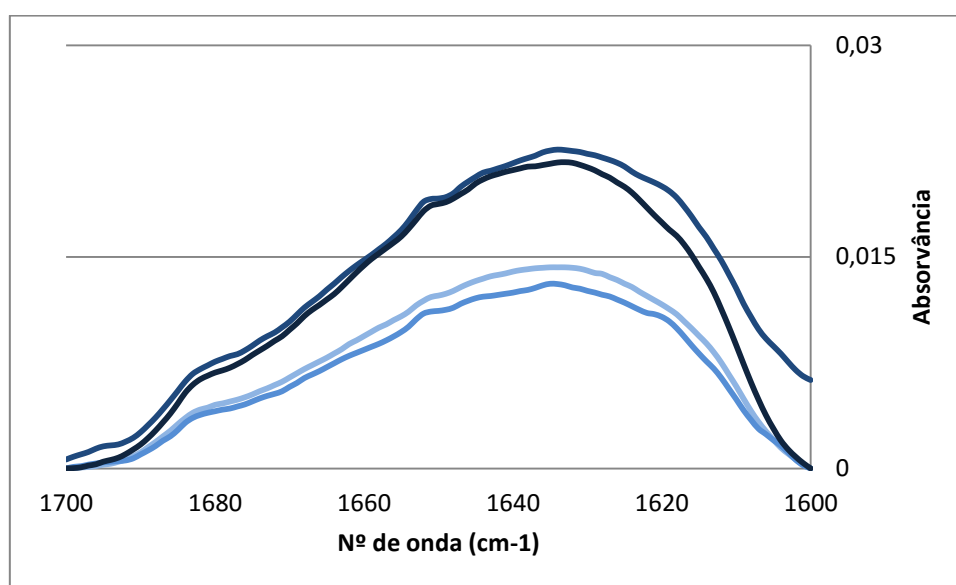
### 1.2.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

Numa primeira análise, recorreu-se à espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR), na região de amida I (figura III.8 e figura III.11) e amida A e B (figuras 3 e 4 e tabelas 0.22 a 0.29 em anexo), nas janelas de 1700 a 1600cm<sup>-1</sup> e 3100 a 2800cm<sup>-1</sup>, respetivamente.<sup>39,72,93,94,97,98</sup> Os espectros obtidos nas duas regiões foram desconvolvidos, como no caso anterior, através da aplicação de tratamentos matemáticos, recorrendo ao programa *PeakFit v4.12*, figura 9 e anexos.

### 1.2.1.1. Região de Amida I

#### 1.2.1.1.1. Condição de pré-tratamento: com aquecimento seguido do acerto de pH

Analizou-se então, diferentes concentrações de TG, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, figura III.8.



**Figura III.8:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH (iv). **Legenda:** a azul-clarinho está representada a condição com 25U de TG/g de proteína; a azul-claro está representada a condição com 50U de TG/g de proteína; a azul está representada a condição com 100U de TG/g de proteína; a azul-escuro está representada a condição com 200U de TG/g de proteína.

De modo a confirmar a reticulação enzimática da  $\beta$ -Lg pela TG comparam-se os resultados obtidos, figura III.8, com os resultados obtidos no estudo da melhor condição de pré-tratamento na condição (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, figura III.4 (d).

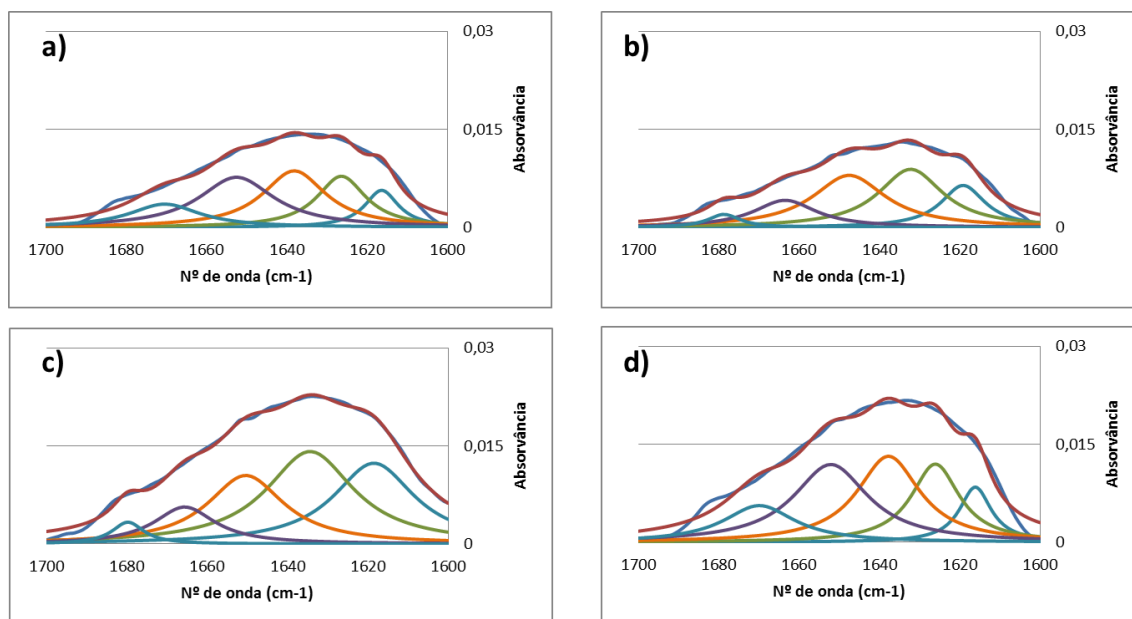
Comparando com a amostra que contém 25U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.8 representado a azul-clarinho, não se verifica alterações no desvio do espectro mas regista-se uma diminuição da intensidade do mesmo. (tabela 0.14 em anexo)

No caso da amostra que contém 50U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.8 representado a azul-claro, denota-se um aumento dos valores de energia, o espectro sofre um desvio para a esquerda, e há uma diminuição dos valores de intensidade. (tabela 0.15 em anexo)

Na amostra que contém 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.8 representado a azul, verifica-se um aumento dos valores de energia, onde o espectro sofre um desvio para a esquerda, e não se regista nenhuma alteração dos valores de intensidade. (tabela 0.16 em anexo)

Por último, na amostra que contém 200U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.8 representado a azul-escuro, não se regista nenhuma alteração dos valores de intensidade e no deslocamento do espectro. (tabela 0.17 em anexo)

Posteriormente, obtiveram-se as bandas correspondentes às diferentes estruturas secundárias da  $\beta$ -lactoglobulina em D<sub>2</sub>O a 5% reticulada com TG, folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas e antiparalelas, folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas e antiparalelas, hélices- $\alpha$  e *random coil*. A área relativa, em percentagem, da influência de cada estrutura secundária também foi obtida através da desconvolução dos espectros pelo do programa *PeakFit v4.12* (figura III.9, figura III.10 e tabelas 0.14 a 0.17 em anexo).



**Figura III.9:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluído, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH (iv). **a)** Com 25U de TG/g de proteína. **b)** Com 50U de TG/g de proteína. **c)** Com 100U de TG/g de proteína. **d)** Com 200U de TG/g de proteína. **Legenda:** a azul-escuro é o espectro observado; a vermelho é o espectro desconvoluído; a azul-ciano encontram-se as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intermoleculares; a verde a banda correspondente às folhas- $\beta$  intramoleculares; a cor-de-laranja a banda correspondente às estruturas *random coil*; a roxo a banda correspondente às hélices- $\alpha$ .

Segundo o descrito anteriormente, de forma a confirmar se ocorreu reticulação enzimática da  $\beta$ -Lg pela TG, comparam-se os resultados obtidos, figura III.9 e figura III.10, com os resultados obtidos no estudo da melhor condição de pré-tratamento na condição (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, figura III.4 (d) e figura III.5, tendo sempre em conta o conjunto de dados representados na figura III.3.

Comparando com a amostra que contém 25U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.9 (a), verifica-se um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas e antiparalelas, a  $1619\text{cm}^{-1}$  e a  $1667\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1629\text{cm}^{-1}$  e das *random coil*, a  $1640\text{cm}^{-1}$ . A área relativa das hélices- $\alpha$  manteve-se, a  $1652\text{cm}^{-1}$ .<sup>16,45,72,83,118–120</sup> (tabelas 0.7 e 0.14 em anexo)

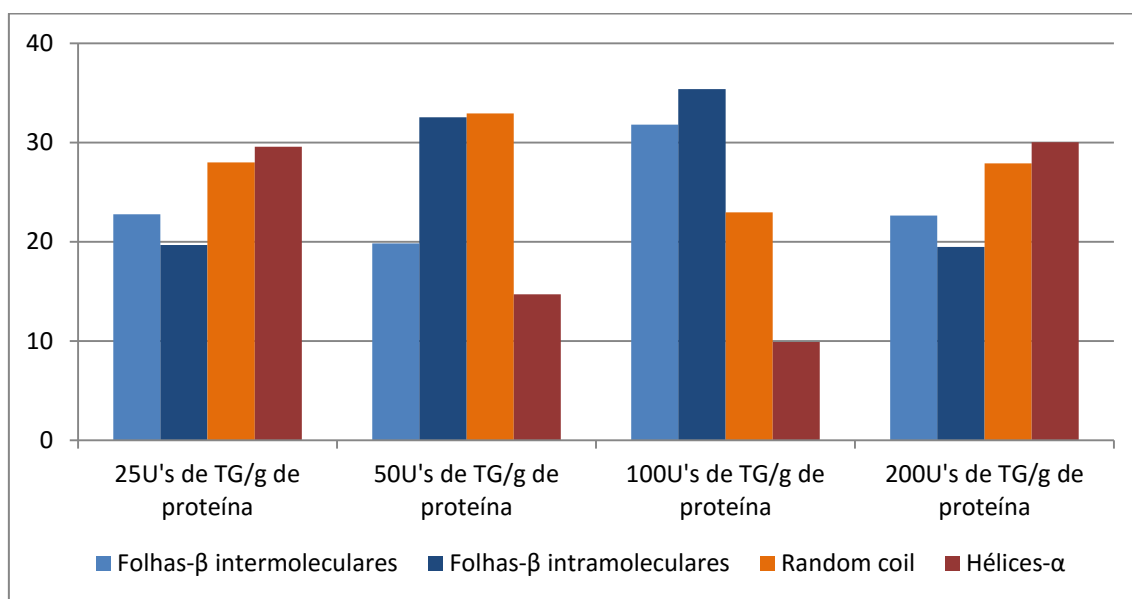
No caso da amostra que contém 50U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.9 (b), relativamente às estruturas secundárias, há um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas, a  $1623\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1635\text{cm}^{-1}$  e das *random coil*, a  $1648\text{cm}^{-1}$ .

Há ainda uma diminuição da influência das hélices- $\alpha$ , a  $1662\text{cm}^{-1}$  e das folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas, a  $1676\text{cm}^{-1}$ .<sup>16,45,72,83,118-120</sup> (tabelas 0.7 e 0.15 em anexo)

Na amostra que contém 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.9 (c), verifica-se um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas, a  $1625\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1637\text{cm}^{-1}$  e das *random coil*, a  $1650\text{cm}^{-1}$ . Há ainda uma diminuição da influência das hélices- $\alpha$ , a  $1664\text{cm}^{-1}$  e das folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas, a  $1677\text{cm}^{-1}$ .<sup>16,45,72,83,118-120</sup> (tabelas 0.7 e 0.16 em anexo)

Por último, na amostra que contém 200U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.9 (d), regista-se uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas, a  $1619\text{cm}^{-1}$  e das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1629\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se também um aumento da influência das *random coil*, a  $1639\text{cm}^{-1}$ , das hélices- $\alpha$ , a  $1652\text{cm}^{-1}$  e das folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas, a  $1667\text{cm}^{-1}$ .<sup>16,45,72,83,118-120</sup> (tabelas 0.7 e 0.17 em anexo)

Realizou-se ainda o somatório das áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  intermoleculares e analisou-se em conjunto com as áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  intramoleculares, das hélices- $\alpha$  e das *random coil*, figura III.10 e tabelas 0.14 a 0.17 em anexo.



**Figura III.10:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com diferentes quantidades de TG, na região de amida I.

Analisando as quatro amostras em estudo (figura III.10) e a condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH (figura III.5), verifica-se que, quando se adiciona transglutaminase, há um aumento dos valores do somatório das áreas analíticas das estruturas *random coil* em todas as amostras, e um aumento das folhas- $\beta$  intermoleculares em todas as amostras exceto na amostra que contém 50U de TG/g de  $\beta$ -Lg, onde o valor se mantém. Relativamente às hélices- $\alpha$  e às folhas- $\beta$  intramoleculares, verifica-se uma diminuição dos valores do somatório das suas áreas analíticas, exceto na amostra que contém 100U de TG/g

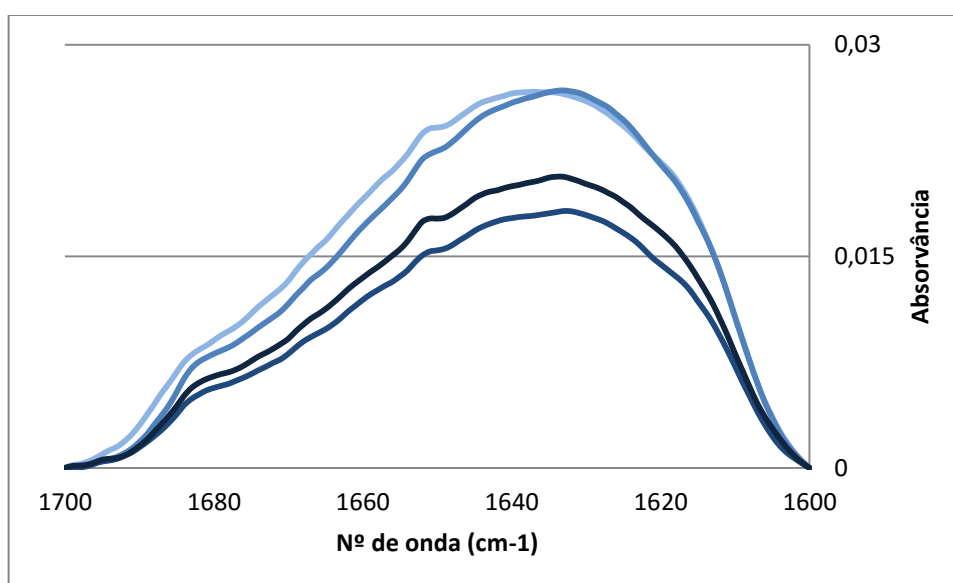


de  $\beta$ -Lg e amostra que contém 50U de TG/g de  $\beta$ -Lg, respetivamente, onde se verifica um aumento. (tabelas 0.14 a 0.17 em anexo)

Deste modo podemos concluir que existe reticulação enzimática da  $\beta$ -Lg pela transglutaminase uma vez que há o favorecimento da formação de folhas- $\beta$  intermoleculares, devido ao rearranjo das estruturas para a formação de polímeros entre diferentes proteínas, e uma diminuição das hélices- $\alpha$ , uma vez que as hélices- $\alpha$  da  $\beta$ -Lg contém dois resíduos de lisina e, quando se dá a reticulação enzimática, a TG catalisa a ligação de um, ou dos dois, resíduos alterando a conformação e, consequentemente, o espectro na região de amida I. 16,45,72,83,118–120

#### 1.2.1.1.2. Condição de pré-tratamento: com acerto de pH seguido de aquecimento

De seguida analisou-se, também, o efeito das diferentes concentrações de TG na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, figura III.11 e figura III.12.



**Figura III.11:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento (v). **Legenda:** a azul-clarinho está representada a condição com 25U de TG/g de proteína; a azul-claro está representada a condição com 50U de TG/g de proteína; a azul está representada a condição com 100U de TG/g de proteína; a azul-escuro está representada a condição com 200U de TG/g de proteína.

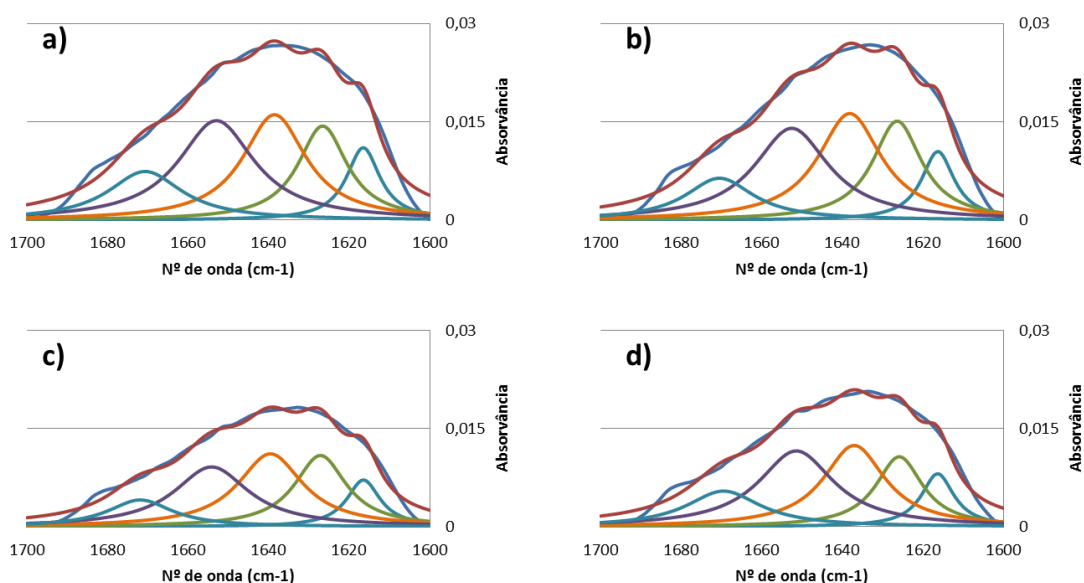
Os resultados obtidos, figura III.11, compararam-se com os resultados obtidos no estudo da melhor condição de pré-tratamento na condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, figura III.4 (e) e figura III.5, de modo a confirmar a reticulação enzimática da  $\beta$ -Lg pela TG.

Nos quatro espectros (figura III.11), comparando com o espectro da condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento sem adição de transglutaminase (figura III.4 (e)), não se



registam alterações significativas quer nos valores de energia, deslocamento do espectro, quer nos valores de intensidade.

Foram obtidas ainda as bandas correspondentes às diferentes estruturas secundárias da  $\beta$ -lactoglobulina em  $D_2O$  a 5% reticulada com TG, folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas e antiparalelas, folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas e antiparalelas, hélices- $\alpha$  e *random coil*. A área relativa, em percentagem, da influência de cada estrutura secundária também foi obtida através da desconvolução dos espectros pelo do programa *PeakFit v4.12* (figura III.12 e tabelas 0.18 a 0.21 em anexo).



**Figura III.12:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluído, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento (v). **a)** Com 25U de TG/g de proteína. **b)** Com 50U de TG/g de proteína. **c)** Com 100U de TG/g de proteína. **d)** Com 200U de TG/g de proteína. **Legenda:** a azul-escuro é o espectro observado; a vermelho é o espectro desconvoluído; a azul-ciano encontram-se as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intermoleculares; a verde a banda correspondente às folhas- $\beta$  intramoleculares; a cor-de-laranja a banda correspondente às estruturas *random coil*; a roxo a banda correspondente às hélices- $\alpha$ .

Os resultados obtidos, figura III.12, compararam-se com os resultados obtidos no estudo da melhor condição de pré-tratamento na condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, figura III.4 (e) e figura III.5, de modo a confirmar a reticulação enzimática da  $\beta$ -Lg pela TG.

Comparando com a amostra que contém 25U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.12 (a), verifica-se um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas e antiparalelas, a  $1619\text{cm}^{-1}$  e a  $1667\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, e das hélices- $\alpha$ , a  $1652\text{cm}^{-1}$ . Há uma diminuição da influência das estruturas *random coil*, a  $1640\text{cm}^{-1}$ , e não se verificam alterações na influência das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1629\text{cm}^{-1}$ .<sup>16,45,72,83,118-120</sup> (tabelas 0.8 e 0.18 em anexo)

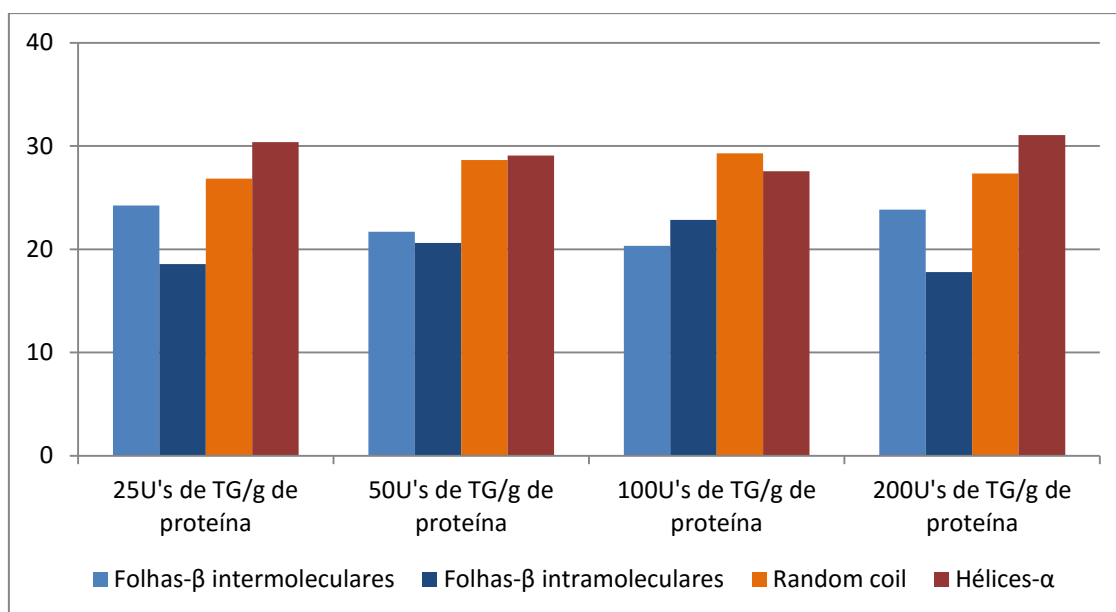
No caso da amostra que contém 50U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.12 (b), verifica-se, relativamente às estruturas secundárias, um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas e antiparalelas, a  $1619\text{cm}^{-1}$  e  $1667\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, e das

folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1629\text{cm}^{-1}$ . Há ainda uma diminuição da influência das *random coil*, a  $1640\text{cm}^{-1}$ , e não há alteração da influência das hélices- $\alpha$ , a  $1652\text{cm}^{-1}$ .<sup>16,45,72,83,118-120</sup> (tabelas 0.8 e 0.19 em anexo)

Na amostra que contém 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.12 (c), relativamente às estruturas secundárias, há um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas e antiparalelas, a  $1619\text{cm}^{-1}$  e  $1669\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1630\text{cm}^{-1}$  e hélices- $\alpha$ , a  $1654\text{cm}^{-1}$ . As estruturas *random coil*, a  $1641\text{cm}^{-1}$  mantém a sua influência.<sup>16,45,72,83,118-120</sup> (tabelas 0.8 e 0.20 em anexo)

Por fim, na amostra que contém 200U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.12 (d), regista-se um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas e antiparalelas, a  $1619\text{cm}^{-1}$  e  $1666\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, e das hélices- $\alpha$ , a  $1651\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se também uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1628\text{cm}^{-1}$ , e das *random coil*, a  $1639\text{cm}^{-1}$ .<sup>16,45,72,83,118-120</sup> (tabelas 0.8 e 0.21 em anexo)

Calculou-se o somatório das áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  intermoleculares e analisou-se em conjunto com as áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  intramoleculares, das hélices- $\alpha$  e das *random coil*, figura III.13 e tabelas 0.18 a 0.21 em anexo.



**Figura III.13:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com diferentes quantidades de TG, na região de amida I.

Comparando as amostras na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com diferentes quantidades de TG (figura III.12 e figura III.13) com a condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento sem adição de TG (figura III.4 (e) e figura III.5), verifica-se que, quando se adiciona transglutaminase, há um aumento dos valores dos somatórios das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares, exceto na amostra

onde se adicionam 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg que diminui. Há também um aumento dos valores do somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares, exceto na amostra onde se adicionam 25U de TG/g de  $\beta$ -Lg onde os valores dos somatórios das áreas analíticas se mantêm. Relativamente às estruturas *random coil*, verifica-se uma diminuição em todas as condições, exceto na amostra onde se adicionam 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg onde os valores dos somatórios das áreas analíticas não se alteram. No caso das hélices- $\alpha$  não há alterações dos somatórios nas duas amostras com a menor quantidade de TG, na amostra onde se adicionam 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg há uma diminuição e na amostra onde se adicionam 200U de TG/g de  $\beta$ -Lg há um aumento dos valores do somatório das suas áreas analíticas. (tabelas 0.18 a 0.21 em anexo)

Deste modo podemos concluir que, havendo o favorecimento da formação de folhas- $\beta$  intermoleculares, devido ao rearranjo das estruturas para a formação de polímeros catalisados pela enzima, e que, apesar das hélices- $\alpha$  se manterem constantes em dois dos casos e aumentarem num, existe reticulação enzimática da  $\beta$ -Lg pela transglutaminase.<sup>16,45,72,83,118–120</sup>

Os dois resíduos de lisina das hélices- $\alpha$  podem não estar a reagir com a TG uma vez que, durante o aquecimento, a  $\beta$ -Lg sofre rearranjos estruturais e tem tendência a formar agregados moleculares que podem mascarar os resíduos impedindo a sua reação com a enzima.<sup>16,45,72,83,118–120</sup>

#### 1.2.1.2. Região de Amida A e B

Obtiveram-se ainda os espectros de FTIR referentes à desconvolução dos espectros, através do programa informático *PeakFit v4.12*, na região de amida A e B, janela de 3100 a 2800 $\text{cm}^{-1}$ , relativos às quatro amostras de  $\beta$ -Lg a 5% com as diferentes quantidades de TG (25, 50, 100 e 200U de TG/g de proteína) para cada uma das condições de pré-tratamento em estudo, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, assim como a percentagem das áreas analíticas relativas de cada banda obtida (figura 3 e tabelas 0.22 a 0.25, figura 4 e tabelas 0.26 a 0.29, em anexo, respetivamente).

Mais uma vez os resultados obtidos, relativos ao estudo da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina foram inconclusivos. Para além de a informação literária nesta área ser pouco abundante chega a ser contraditória em alguns casos<sup>72,112,113</sup>, autores como Eissa<sup>72</sup> dizem que não se registam alterações significativas nesta zona.

Na pesquisa literária que se realizou, quando se adiciona a TG, deveria haver um deslocamento da banda a 2935 $\text{cm}^{-1}$  para 2934 $\text{cm}^{-1}$  com um aumento da área analítica, um deslocamento da banda a 2901 $\text{cm}^{-1}$  para 2889 $\text{cm}^{-1}$  também com um aumento da área analítica, e deveria existir uma banda a 2940 $\text{cm}^{-1}$ .<sup>72,93,98</sup>

No caso de estudo apresentado, nunca surge esta banda a 2940  $\text{cm}^{-1}$ , e as restantes bandas não se correlacionam entre si.

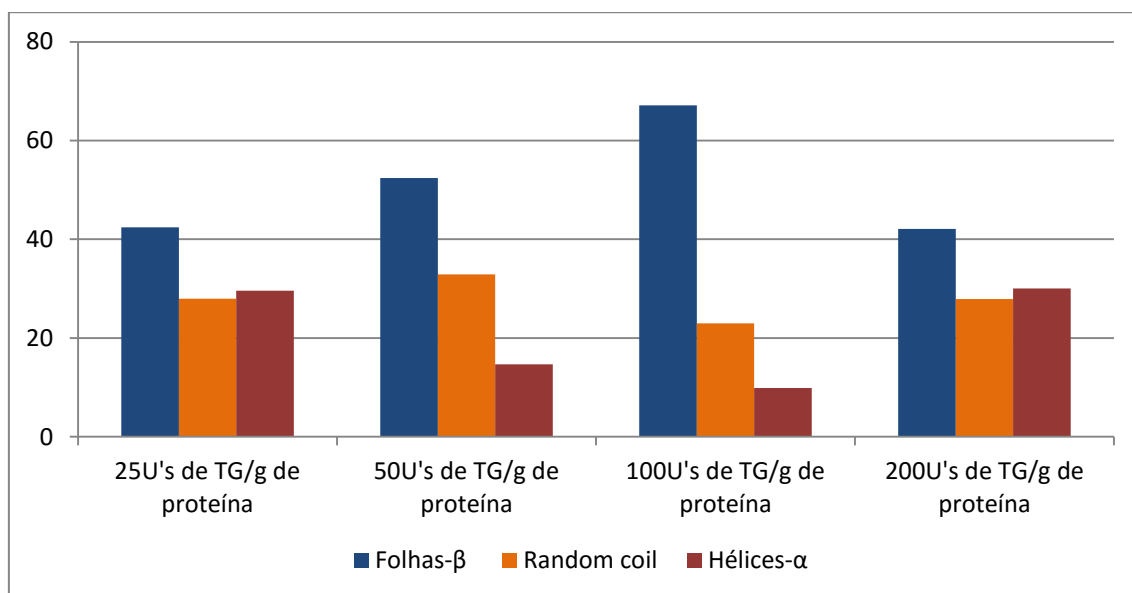
Após uma análise dos espectros obtidos nas 4 concentrações de TG testadas nas duas melhores condições de pré-tratamento (figura 3 e tabelas 0.22 a 0.25, figura 4 e tabelas 0.26 a 0.29, em anexo) não se verificou consistência quer na deslocação quer no valor das áreas

relativas, ou seja, não há um comportamento tendência e, portanto, não se conseguiu fazer uma generalização ou chegar a uma conclusão específica.

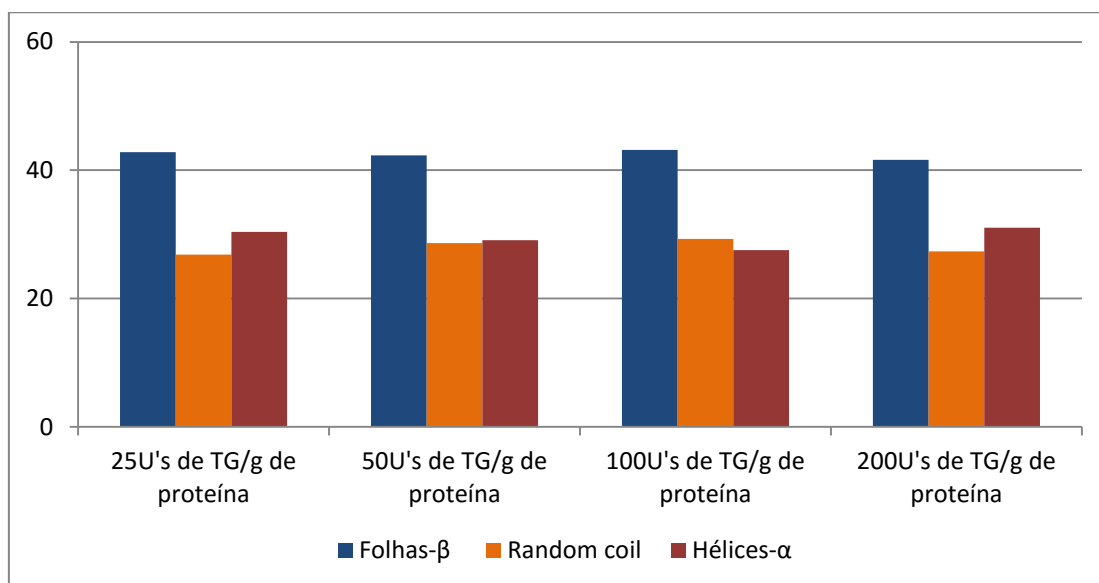
No restante estudo não serão realizados mais análises nesta região do espectro uma vez que não se conseguem tirar conclusões nem sobre o efeito de desnaturação nem sobre se há reticulação enzimática.

### 1.2.1.3. Comparação das duas condições em estudo

Sabendo então que nas oito amostras estudadas neste capítulo há reticulação enzimática, é necessário verificar qual delas apresenta a melhor condição para se dar a reticulação da  $\beta$ -Lg pela TG. Para tal calcularam-se o somatório de todas as folhas- $\beta$ , figura III.14 (tabelas 0.14 a 0.17 em anexo) e figura III.15 (tabelas 0.18 a 0.21 em anexo).



**Figura III.14:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com diferentes quantidades de TG, na região de amida I.



**Figura III.15:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com diferentes quantidades de TG, na região de amida I.

Das duas condições em estudo, a que apresenta maior quantidade de folhas- $\beta$  e menor quantidade de hélices- $\alpha$  é a condição (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg, figura III.14. O que vai de encontro com a literatura uma vez que, quanto mais eficiente for a reticulação enzimática, mais folhas- $\beta$  são geradas e as hélices- $\alpha$  tendem a desaparecer, diminuindo ao longo da reação de reticulação.<sup>16,45,72,83,112,113,117-120</sup>

Contudo, a melhor condição de pré-tratamento sem adição de TG é a (v) com acerto de pH seguida de aquecimento (figura III.4 (e)) que é a mesma utilizada na literatura encontrada para a reticulação com a TG.<sup>35,72,80,105-107,109-111</sup> No entanto, como a TG precisa de estar a pH 7 para conseguir reticular a proteína, quando se acerta o pH depois do aquecimento este mantém-se até se dar a reação. Durante o estudo verificou-se que, quando se acertava o pH antes do aquecimento, este encontrava-se inferior a 7 quando se iniciava a reação de reticulação.<sup>18,121,122</sup> Apesar de a TG estar ativa numa gama de pH de 5 a 8, e continuar a reticular na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, é a pH 7 que ela expressa a sua melhor atividade.<sup>18,121,122</sup>

### 1.2.2. Análise segundo a eletroforese em géis de poliacrilamida: SDS-PAGE

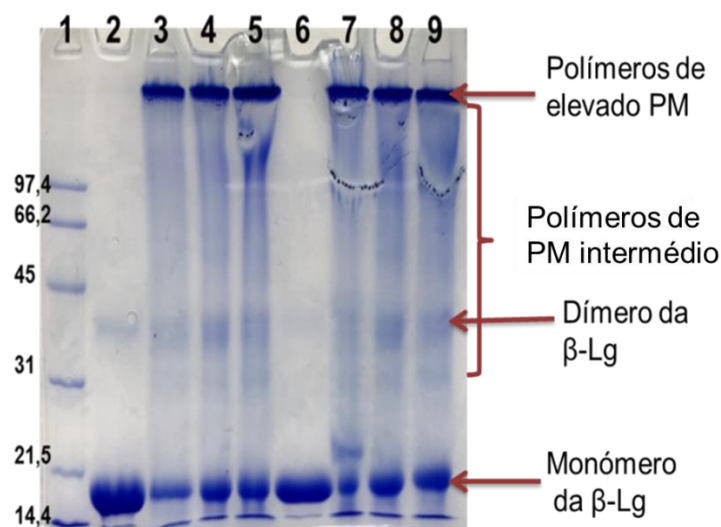
A determinação de proteínas por eletroforese em géis de poliacrilamida foi outro método utilizado para confirmar a reticulação da proteína assim como para verificar qual a quantidade de TG e o tempo de incubação mais adequados para otimização do processo de reticulação.

As amostras foram preparadas com e sem a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me). Este agente redutor causa a redução das pontes dissulfureto que são responsáveis pela estrutura nativa da proteína, assim, ocorre a destruição das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas.<sup>116,117</sup>

Neste caso de estudo, o  $\beta$ -Me foi utilizado como reagente de dissociação para obter a degradação de co-agregados possivelmente formados por interações dissulfureto.<sup>116</sup>

Realizou-se então a corrida das amostras com diferentes quantidades de TG (25, 50 e 100U's de TG/g de proteína) nas duas melhores condições de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com e sem adição de  $\beta$ -Me, figura III.16 e figura III.17, respetivamente.

#### 1.2.2.1. SDS-PAGE na presença de $\beta$ -Mercaptoetanol



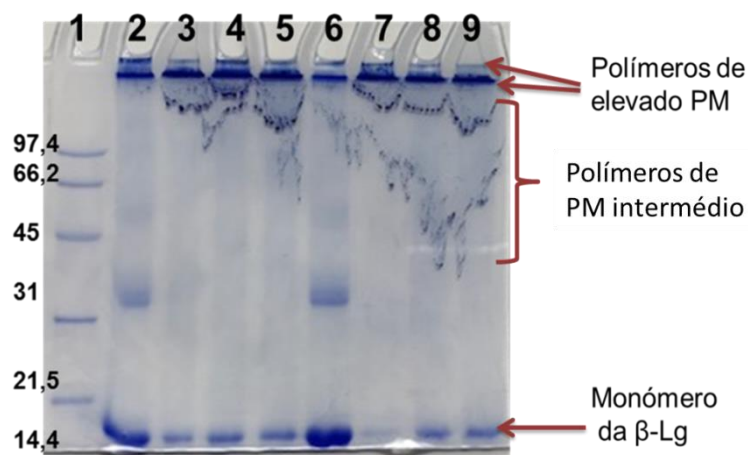
**Figura III.16:** Gel de poliacrilamida a 12% com duas condições de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares Low Range da Bio-Rad. **Poço 2:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH. **Poço 3:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 25U de TG/g de proteína; **Poço 4:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 50U de TG/g de proteína; **Poço 5:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de proteína; **Poço 6:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento. **Poço 7:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento com 25U de TG/g de proteína; **Poço 8:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento com 50U de TG/g de proteína; **Poço 9:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento com 100U de TG/g de proteína.

No gel de poliacrilamida onde se adicionou o agente redutor,  $\beta$ -Me, figura III.16, verifica-se a existência de uma banda no topo do gel, em ambas as condições, poços 3 a 5 e 7 a 9, que correspondem aos polímeros de elevado peso molecular que são originados pela reticulação da  $\beta$ -Lg com a TG, existe ainda um ligeiro arrastamento que corresponde aos polímeros de pesos moleculares intermédios.<sup>33,73,105,108-110,116</sup> Em todos os poços, 2 a 9, verifica-se a existência de uma banda no fundo do gel, a 18,4kDa, que corresponde ao monómero da  $\beta$ -Lg. Aparece ainda uma banda muito ténue, a aproximadamente 36,8kDa, que corresponde ao dímero da  $\beta$ -Lg, não deveria acontecer uma vez que se adicionou  $\beta$ -Me. O facto de a banda aparecer pode significar que não se adicionou quantidade suficiente do agente redutor à amostra e o existente não foi suficiente para quebrar todas as pontes dissulfureto da proteína existente.<sup>33,73,105,108-110,116,117</sup>

Na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, poços 2 a 5, verifica-se, no poço 2, que corresponde à amostra de proteína sem adição de TG, que a banda do monómero da proteína é muito mais intensa que nos restantes poços da mesma condição, poços 3 a 5. O desaparecimento gradual desta banda vem corroborar com a informação anterior que nos diz que a  $\beta$ -Lg está a ser reticulada pela TG. O mesmo acontece no caso da segunda condição em estudo, (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, poços 6 a 9, onde se verifica uma diminuição da banda correspondente ao monómero da  $\beta$ -Lg, poços 7 a 9, quando comparado com o monómero da proteína na mesma condição sem adição de TG, poço 6.

Das suas condições a que aparenta ter uma banda de monómero menos intensa e uma banda de polímeros de elevado peso molecular mais intensa, indicativo de que houve reticulação, é a condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, poços 3 a 5, que corrobora com as conclusões obtidas no FTIR. Contudo, a condição que aparenta ter a banda do monómero menos intensa, contrariamente ao FTIR (figura III.14), é a correspondente à amostra com 25U de TG/g de proteína.<sup>33,73,105,108–110,116</sup>

#### 1.2.2.2. SDS-PAGE na ausência de $\beta$ -Mercaptoetanol



**Figura III.17:** Gel de poliacrilamida a 12% com duas condições de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares Low Range da Bio-Rad. **Poço 2:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH. **Poço 3:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 25U de TG/g de proteína; **Poço 4:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 50U de TG/g de proteína; **Poço 5:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de proteína; **Poço 6:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento. **Poço 7:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento com 25U de TG/g de proteína; **Poço 8:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento com 50U de TG/g de proteína; **Poço 9:**  $\beta$ -Lg na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento com 100U de TG/g de proteína.

No gel de poliacrilamida a 12% sem adição de  $\beta$ -Me, figura III.17, verifica-se a existência de uma banda no fundo do gel, a 18,4kDa, correspondente ao monómero da  $\beta$ -Lg, e a existência de uma banda no topo do gel, assim como retenção de amostra nos poços. Nos poços 2 e 6, onde se colocou amostra de proteína sem adição de TG, estas bandas, no topo do



gel e retenção nos poços, pode ser devido aos agregados formados durante o tratamento térmico a que a proteína foi sujeita durante o pré-tratamento.<sup>72,91,116</sup> Nos restantes poços (3 a 5 e 7 a 9), a presença destas mesmas bandas, assim como o arrastamento, indicam a presença de polímeros de elevado peso molecular, ou de peso molecular intermédio, respetivamente, formados pela reticulação da  $\beta$ -Lg com a TG.<sup>33,73,105,108–110,116</sup>

Outro comprovativo da existência de reticulação é a diminuição de intensidade das bandas dos monómeros da proteína nas amostras em que se adicionou TG, poços 3 a 5 e 7 a 9, em ambas as condições de pré-tratamento em estudo.<sup>33,73,105,108–110,116</sup>

Neste caso, e contrariamente ao obtido no FTIR (figura III.14 e figura III.15) e no gel de SDS-PAGE em que se adicionou o  $\beta$ -Me (figura III.16), a melhor condição de pré-tratamento parece ser a (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com 25U de TG/g de  $\beta$ -Lg, uma vez que a banda correspondente ao monómero da  $\beta$ -Lg é praticamente inexistente.<sup>33,73,105,108–110,116</sup>

### **1.3. Estudo da cinética com transglutaminase em condições otimizadas de concentração e de enzima**

Uma vez confirmada a reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina pela transglutaminase fez-se o estudo cinético da reação.

Decidiu-se fazer o estudo cinético na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, uma vez que foi a melhor condição segundo os resultados obtidos pelo FTIR (figura III.14 e tabela 0.7 e tabelas 0.14 a 0.17 em anexo) e pela eletroforese em gel de poliacrilamida com a adição do agente redutor (figura III.16). Uma vez que nos diferentes métodos de análise utilizados os resultados da melhor concentração de TG foram contraditórios, 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg no FTIR e 25U de TG/g de  $\beta$ -Lg na eletroforese em SDS-PAGE, decidiu-se fazer o estudo cinético da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com a TG nas duas concentrações de TG.

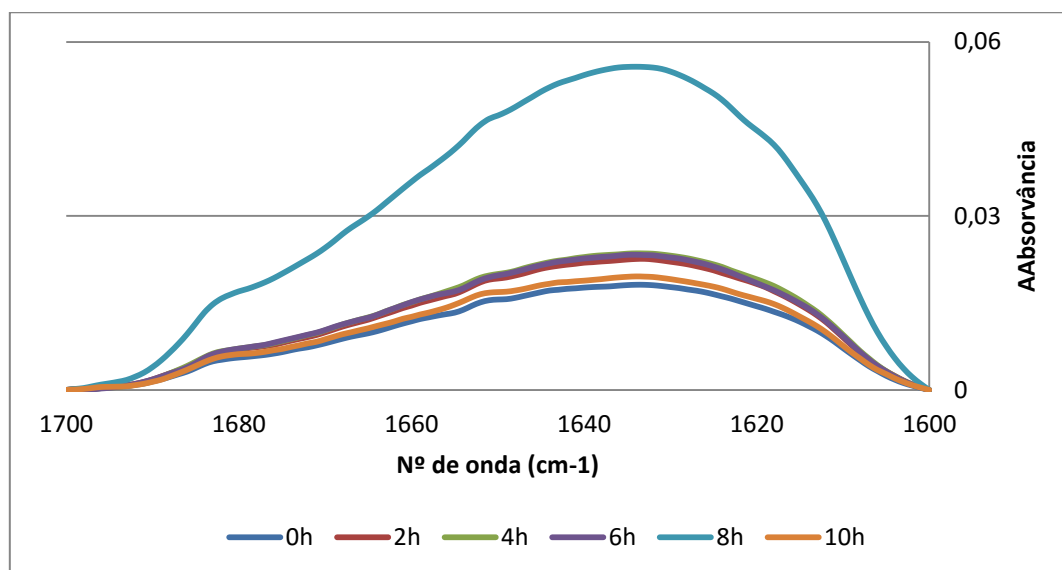
#### **1.3.1. Condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de $\beta$ -lactoglobulina**

Iniciou-se pela condição (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg, que foi à estufa a 50°C durante 10h<sup>106</sup>, uma vez que a TG perde atividade após as 12h de reação<sup>72</sup>, e foram-se retirando alíquotas de 2h em 2h.<sup>35,72,80,105–107,109–111</sup>

##### **1.3.1.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier**

Recorreu-se à espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR), na região de amida I (figura III.18 e tabela 0.30 em anexo), para se proceder ao estudo cinético da adição de 100U de TG/g de proteína.<sup>39,72,93,97,98</sup>





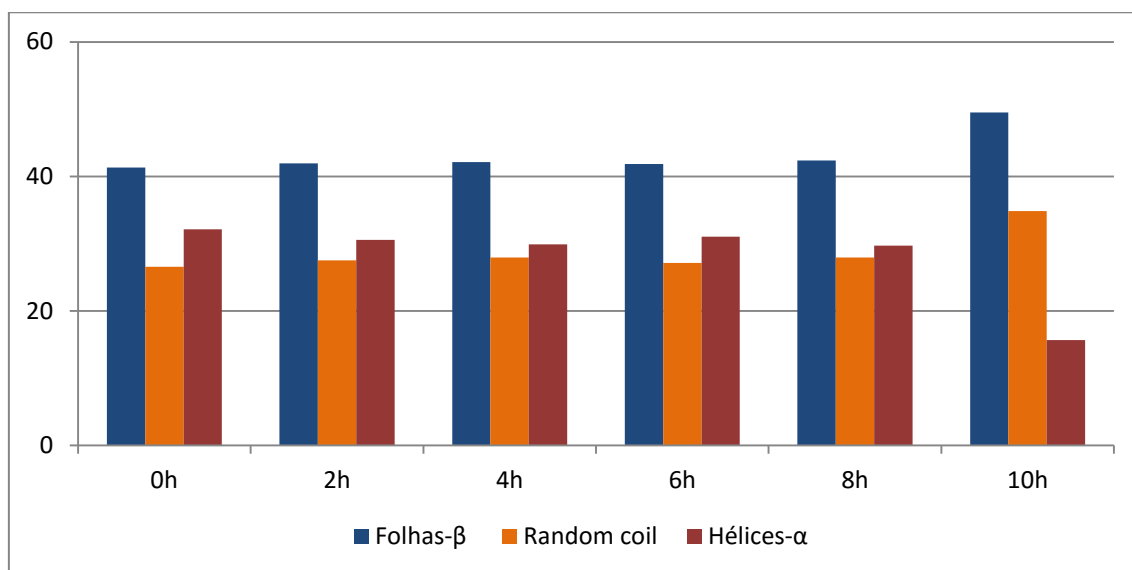
**Figura III.18:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Analisando o aspeto geral dos espectros correspondentes às várias horas de cinética, verifica-se um grande aumento da intensidade do espectro às 8h, comparativamente às restantes. Verifica-se que a hora 0 e 10 são, praticamente, sobreponíveis, assim como as horas 2, 4 e 6. A hora que apresenta uma intensidade mais reduzida é a 0h.

A forma dos espectros é semelhante em todas as horas não sendo possível tirar qualquer tipo de conclusões.

De seguida, procedeu-se à desconvolução dos espectros, através da aplicação de tratamentos matemáticos, recorrendo ao programa *PeakFit v4.12*, como anteriormente descrito, onde se obtiveram as bandas correspondentes às diferentes estruturas secundárias dos polímeros da  $\beta$ -lactoglobulina em  $D_2O$  a 5% reticulada com TG, folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, hélices- $\alpha$  e *random coil*. A área relativa, em percentagem, da influência de cada estrutura secundária também foi obtida através da desconvolução dos espectros pelo do programa *PeakFit v4.12* (figura III.19 e tabela 0.30 em anexo).

De forma a obter-se uma análise mais sucinta e direta, calculou-se o somatório das áreas analíticas relativas de todas as folhas- $\beta$  em solução, das hélices- $\alpha$  e das *random coil*, figura III.19 e tabela 0.30 em anexo.



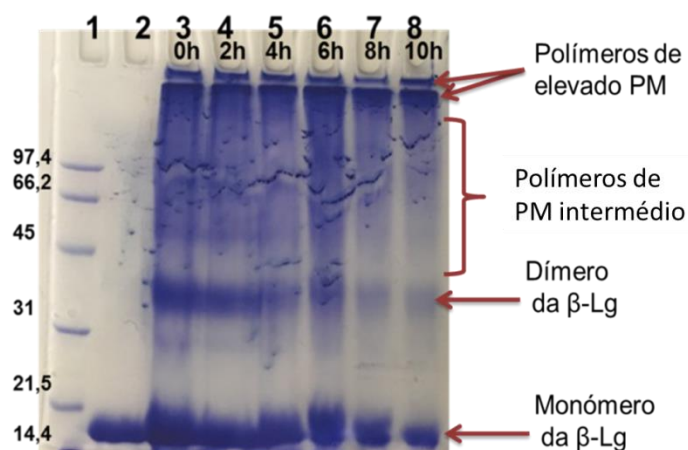
**Figura III.19:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, na região de amida I.

Analisando o somatório da influência de todas as folhas- $\beta$  em solução, figura III.19, verifica-se que a sua influência mantém-se constante até à hora oito, assim como as restantes estruturas. Regista-se um aumento da sua influência na hora 10 assim como das estruturas *random coil* e uma diminuição da influência das hélices- $\alpha$ .<sup>16,45,72,83,112,113,117-120</sup> Verifica-se então que onde existe uma maior eficiência da reação de reticulação é na hora 10. Contudo, parece que a cinética se encontra estagnada da hora zero até à hora oito dando a ideia de que a reação de reticulação ocorreu logo no início. Isto pode dever-se à grande quantidade de TG adicionada e à forte afinidade que a  $\beta$ -Lg tem pela enzima uma vez que alguns autores defendem a utilização de quantidades menores de enzima, 10U de TG/g de  $\beta$ -Lg<sup>106,107</sup>, 12,5 U de TG/g de  $\beta$ -Lg<sup>111</sup> e 25 U de TG/g de  $\beta$ -Lg<sup>109,110</sup>.

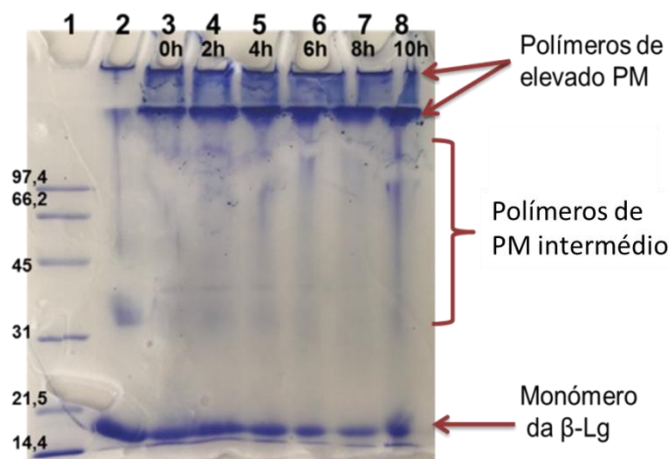
Comparando com a  $\beta$ -Lg na mesma condição de pré-tratamento e sem adição de TG, figura III.4 (d) e figura III.5, verifica-se que em todas as horas de cinética, o somatório das áreas analíticas da influência das folhas- $\beta$  é sempre superior. Portanto, durante a cinética da reação houve reticulação enzimática.<sup>16,45,72,83,118-120</sup>

### 1.3.1.2. Análise segundo a eletroforese em géis de poliacrilamida: SDS-PAGE

De forma a complementar e tentar perceber melhor o que aconteceu durante a reação de reticulação durante a cinética, realizou-se então a eletroforese em géis de poliacrilamida a 12% das amostras com as diferentes horas de cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg na condições de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de proteína, com e sem adição de  $\beta$ -Me, figura III.20 e figura III.21, respetivamente.



**Figura III.20:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com a  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares Low Range da Bio-Rad. **Poço 2:**  $\beta$ -Lg sem adição de TG. **Poços 3 a 8:**  $\beta$ -Lg com 100U de TG/g de proteína e tempos de incubação indicados.



**Figura III.21:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com a  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares Low Range da Bio-Rad. **Poço 2:**  $\beta$ -Lg sem adição de TG. **Poços 3-8:**  $\beta$ -Lg com 100U de TG/g de proteína e tempos de incubação indicados.

Analisando os géis de SDS-PAGE, com e sem a adição do agente redutor, figura III.20 e figura III.21, respetivamente, verifica-se a existência de polímeros de elevado peso molecular em todos os poços que contém a proteína reticulada, poços 3 a 8 em ambos os casos, pela presença de bandas no topo do gel assim como de retenção de amostra nos poços.<sup>108,109</sup>

Verifica-se também que as bandas a 18,4kDa que correspondem ao monómero da  $\beta$ -Lg, quando comparadas com a amostra de  $\beta$ -Lg sem adição de TG, poço 2 da figura III.20 e figura III.21, vão diminuindo ligeiramente ao longo da cinética (poço 2 a 8, em ambos os casos).<sup>35,73,105,108,109</sup>

No gel de SDS-PAGE em que se adicionou o agente redutor verifica-se uma saturação na corrida do gel, principalmente na zona onde aparecem os polímeros de elevado peso molecular e de peso molecular intermédio, figura III.20.<sup>108,109</sup> Isto significa que o agente redutor cliva as pontes dissulfureto que estão presentes nos polímeros conferindo-lhes pesos

moleculares intermédios que vão provocar o arrastamento.<sup>116,117</sup> Verifica-se ainda a existência de uma banda a 36,8kDa que corresponde ao dímero da  $\beta$ -Lg.<sup>35,73,105,108,109</sup>

Já no gel de SDS-PAGE onde não se adiciona o  $\beta$ -Me, figura III.21, não se vê um arrastamento da amostra tão intenso. Neste caso, como não se adicionou agente redutor, os polímeros de  $\beta$ -Lg reticulada, assim como os agregados moleculares, não foram clivados pelo  $\beta$ -Me, mantendo-se intactos.<sup>116,117</sup> Devido ao seu elevado peso molecular, ficaram retidos nos poços e no topo do gel podendo ainda, terem ficado na amostra por não ter sido possível pipetar.<sup>108,109</sup>

Comparando os resultados obtidos nas duas técnicas de análise, espectroscopia de FTIR e eletroforese de SDS-PAGE, conclui-se que a reação de reticulação ocorre e que a cinética fica estagnada nas primeiras horas de reação transmitindo a ideia de que a reação de reticulação ocorre logo nas primeiras horas. Estes resultados estão de acordo com Villas-Boas<sup>109,123</sup> e Sabadin<sup>110</sup> que realizam o estudo da cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com a TG em apenas 3h, assim como Eissa<sup>105</sup> que utiliza 5h de reação.

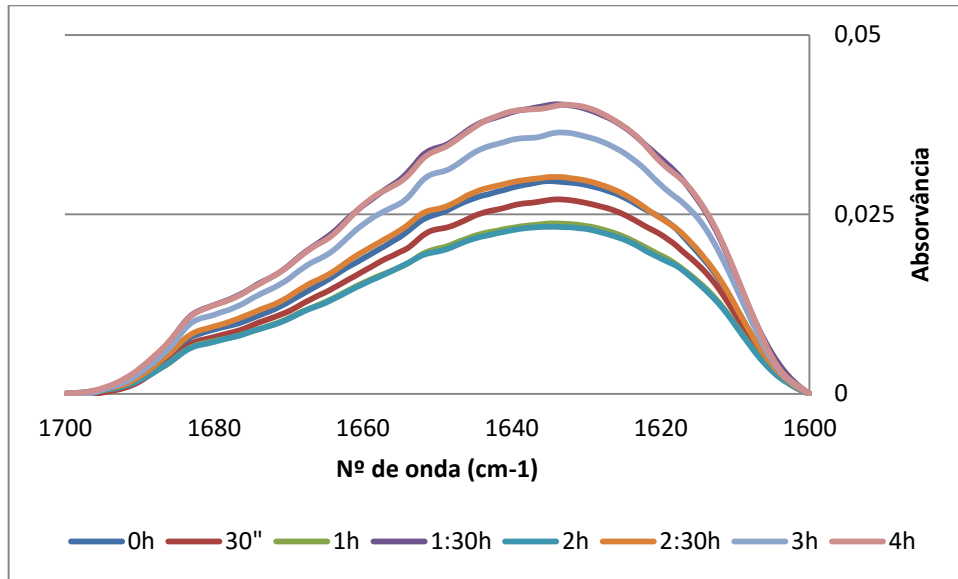
O fato de aparecer saturação de amostra no gel com adição de  $\beta$ -Me, figura III.20, pode ser também indicativo de excesso de TG. Assim, e como já previsto pelos resultados obtidos no capítulo anterior referentes à quantidade TG a utilizar, realizou-se novamente o estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -Lg pela TG, onde se utilizaram 25U de TG/g de proteína. Outra alteração realizada neste estudo cinético foi a alteração da duração de cinética de 10h para 4h. Esta alteração ocorreu devido aos resultados obtidos no estudo anterior, com 100U de TG/g de proteína, e também devido aos estudos realizados por Villas-Boas<sup>109,123</sup> e Sabadin<sup>110</sup> que só utilizam 3h de reação para o estudo cinético nas mesmas condições.

### **1.3.2. Condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 25U de TG/g de $\beta$ -lactoglobulina**

Por último, analisou-se a condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com 25U de TG/g de  $\beta$ -Lg, que foi à estufa a 50°C durante 4h<sup>105,109,110</sup>, devido às conclusões retiradas no estudo cinético anterior, e foram-se retirando alíquotas de 30min em 30min.<sup>35,72,80,105–107,109–111</sup>

#### **1.3.2.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier**

Analisou-se os resultados obtidos pela espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR), na região de amida I (figura III.22 e tabela 0.31 em anexo).<sup>39,72,93,97,98</sup>

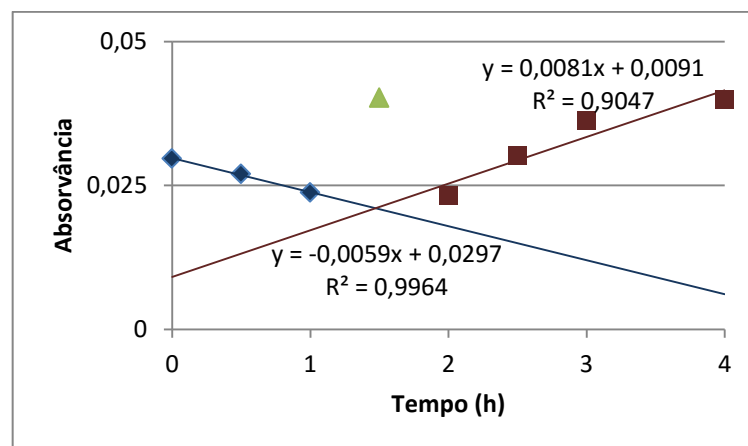


**Figura III.22:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 25U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Numa primeira análise verificamos que os espectros das diferentes horas de cinética apresentam a mesma configuração. Não se regista nenhum comportamento tendência com o aumento ou diminuição das horas de cinética.

Verifica-se que as horas 4 e 1:30 são sobreponíveis e apresentam os valores de intensidade mais elevadas, assim como os espectros das 2:30h e 0h, e das 2h e 1h, sendo que os ultimos apresentam os valores mais baixos de intensidade.

É de notar uma diminuição da intensidade desde a hora zero à primeira hora de reação e um aumento da intensidade que começa na segunda hora até à quarta hora, figura III.23.

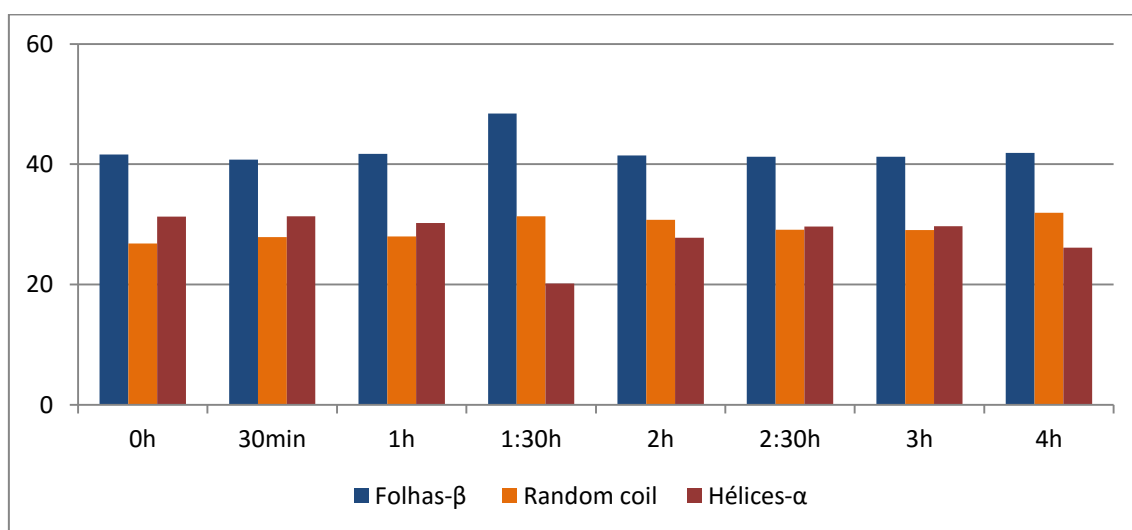


**Figura III.23:** Gráfico com a absorvância a  $1635\text{cm}^{-1}$  ( $n^\circ$  de onda) em função do tempo, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 25U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. **Legenda:** os quadrados a azul representam as 0h, os 30'' e a 1h, os quadrados a vermelho representam as 2h, 2:30h, 3h e 4h e o triângulo a verde representa a 1:30h de reação.

Posteriormente, os espectros foram desconvolvidos, recorrendo ao programa *PeakFit* v4.12. Através da aplicação de tratamentos matemáticos, onde se obtiveram as bandas

correspondentes às diferentes estruturas secundárias dos polímeros da  $\beta$ -lactoglobulina em  $D_2O$  a 5% reticulada com TG, folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, hélices- $\alpha$  e *random coil*. Foi ainda obtida, através da desconvolução dos espectros pelo do programa *PeakFit v4.12*, a área relativa, em percentagem, da influência de cada estrutura secundária (tabela 0.31 em anexo).

Procedeu-se ao cálculo do somatório das áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  e analisou-se em conjunto com as áreas analíticas relativas das hélices- $\alpha$  e das *random coil*, figura III.24 e tabela 0.30 em anexo.



**Figura III.24:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 25U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de ajuste de pH, na região de amida I.

Pela análise da figura III.24, verifica-se que o somatório da influência de todas as folhas- $\beta$  presentes na amostra analisada mantém-se até à primeira hora, assim como as hélices- $\alpha$  e as *random coil*. Da hora um até à hora e meia de reação há um aumento da influência das folhas- $\beta$  e das *random coil* e uma diminuição das hélices- $\alpha$ .

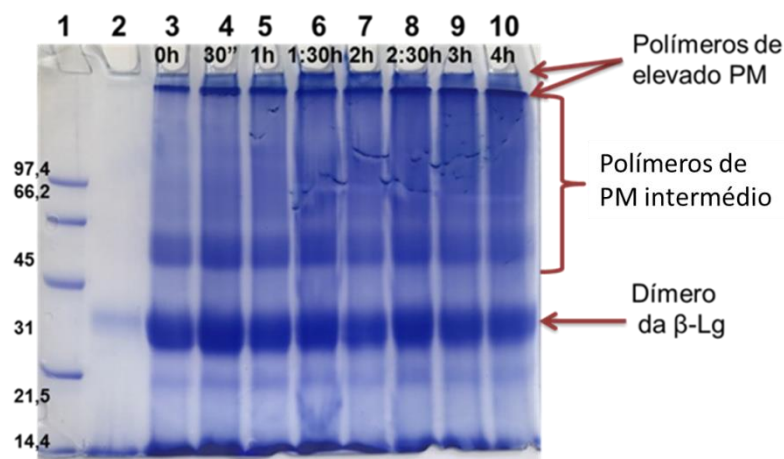
Da 1:30h às 2h regista-se uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  e um aumento das hélices- $\alpha$ . A partir da segunda hora e até ao final da cinética enzimática não se registam alterações significativas na influência das estruturas secundárias, o que nos dá a informação de que a reação de reticulação estagnou.<sup>16,45,72,83,112,113,117-120</sup>

Onde se regista uma maior eficiência da reação de reticulação é à 1:30h, o que permite concluir que, neste ponto, já se deu a reticulação da  $\beta$ -Lg com a TG.<sup>16,45,72,83,112,113,117-120</sup>

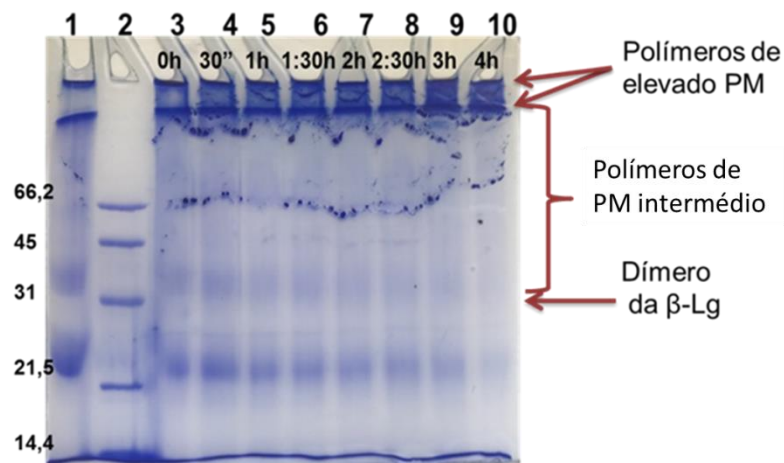
Fazendo a comparação com a  $\beta$ -Lg na mesma condição de pré-tratamento e sem adição de TG, figura III.4 (d) e figura III.5, verifica-se que, em todas as horas de cinética, o somatório das áreas analíticas da influência das folhas- $\beta$  é sempre superior. Logo, houve reticulação enzimática.<sup>16,45,72,83,118-120</sup>

### 1.3.2.2. Análise segundo a eletroforese em géis de poliacrilamida: SDS-PAGE

Por fim, realizou-se a eletroforese em géis de poliacrilamida a 12% das amostras com as diferentes horas de cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg na condições de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com 25U de TG/g de  $\beta$ -Lg, com e sem adição de  $\beta$ -Me, figura III.25 e figura III.26, respetivamente.



**Figura III.25:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com 25U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com a  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares *Low Range da Bio-Rad*. **Poço 2:**  $\beta$ -Lg sem adição de TG. **Poço 3 ao 10:**  $\beta$ -Lg com TG 100 U/g de proteína e tempos de incubação indicados.



**Figura III.26:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg com 25U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com a  $\beta$ -lactoglobulina a 5% diluída para 15 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:**  $\beta$ -Lg sem adição de TG. **Poço 2:** marcador de pesos moleculares *Low Range da Bio-Rad*. **Poço 3 ao 10:**  $\beta$ -Lg com TG 100 U/g de proteína e tempos de incubação indicados.

Nos géis de SDS-PAGE, com e sem a adição do agente redutor, figura III.24 e figura III.25, respetivamente, verifica-se a existência de polímeros de elevado peso molecular em todos os poços que contém a proteína reticulada, poços 3 a 10 em ambos os casos, pela



presença de bandas no topo do gel assim como de retenção de amostra nos poços.<sup>108,109</sup> Estas bandas vão aumentando até à 1:30h (poço 6) mantendo-se constantes até às 4h, figura III.25.

As bandas a 36,8kDa que correspondem ao dímero da  $\beta$ -Lg, quando comparadas com a amostra de  $\beta$ -Lg sem adição de TG, poço 2 e 1 das figuras III.24 e III.25, respetivamente, vão diminuindo ligeiramente ao longo da cinética (poço 3 a 8), em ambos os casos.<sup>35,73,105,108,109</sup>

Nas amostras em que se adicionou o agente redutor, figura III.24, verifica-se uma saturação na corrida do gel, principalmente na zona onde aparecem os polímeros de elevado peso molecular e de peso molecular intermédio,<sup>108,109</sup> que é indicativo de que o  $\beta$ -Me reage com a  $\beta$ -Lg reticulada, clivando as pontes dissulfureto conferindo-lhe pesos moleculares intermédios que vão provocar o arrastamento.<sup>116,117</sup>

No caso em que não se adiciona o  $\beta$ -Me, figura III.25, o arrastamento da amostra que se é praticamente inexistente, como não se adicionou agente redutor, os polímeros de  $\beta$ -Lg reticulada, assim como os agregados moleculares, não são clivados pelo  $\beta$ -Me, mantendo-se intactos.<sup>116,117</sup> Estes ficaram retidos nos poços e no topo do gel podendo ainda, terem ficado na amostra, por não ter sido possível pipetar.<sup>108,109</sup>

Comparando os resultados obtidos nesta metodologia com os obtidos pela espectroscopia de FTIR, pode-se concluir que a reação de reticulação ocorre. Verifica-se que a partir da 1:30h, a cinética fica estagnada o que corrobora com o estudo da cinética realizado com 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg.<sup>72,105,109,110,123</sup>

Em suma, a reação de reticulação da  $\beta$ -Lactoglobulina a 5% em D<sub>2</sub>O, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguida de acerto de pH, pela transglutaminase ocorre nos primeiros 90 a 180 minutos de reação, quando se adiciona 25U de TG/g de proteína. No caso em que se adicionaram 100U de TG/g de  $\beta$ -Lg os resultados foram mais inconclusivos, contudo podemos afirmar que a reação ocorreu logo nas primeiras horas de cinética.

## 2. Soro comercial

O soro de leite, que durante anos foi considerado, pela indústria dos laticínios, como um resíduo alimentar, tem vindo a ganhar força como suplemento proteico. É rico em recursos naturais como proteínas, lactose e gorduras que são recicladas por vários processos biotecnológicos e são usados como suplemento alimentar.<sup>13,26</sup>

O soro de leite apresenta uma mistura heterogénea de proteínas completa e diversificada, de elevada qualidade, contendo todos os aminoácidos essenciais e vários péptidos bioativos. Devido a estas características apresenta propriedades biológicas e bioquímicas diversas que são responsáveis por muitos dos benefícios funcionais aplicados à saúde humana.<sup>28</sup>

A grande diversidade de proteínas presentes no soro de leite possuem funcionalidades que permitem ajudar na perda de peso, no controlo dos índices de glicémia, na redução do colesterol, na diminuição da pressão sanguínea, e no desenvolvimento de massa muscular. Estas propriedades funcionais são atribuídas, maioritariamente, à  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), que constitui 50% da constituição proteica do soro.<sup>13,26,28</sup>



O soro de leite, para além da  $\beta$ -Lg, contém na sua constituição proteica a  $\alpha$ -albumina,  $\alpha$ -La (25%), a imunoglobulina (10 a 15%), o glicomacropeptídeo caseína (10 a 15%), a albumina de soro bovino (10%), a lactoferrina (aproximadamente 1%) e a lactoperoxidase (menos de 1%).<sup>13,28</sup>

Tanto a  $\beta$ -Lg como a  $\alpha$ -La são alergénicas, neste estudo pretende-se reduzir a alergenicidade de ambas sem ser necessário recorrer à sua extração. Para tal recorreu-se à reticulação enzimática pela transglutaminase (TG).<sup>13,14,28,118</sup>

O soro de leite comercial utilizado é da *Total Whey*, com sabor a morango, e foi fornecido pela *Gold Nutrition*. Este soro é enriquecido com aroma de morango, corantes, espessantes, edulcorantes e um complexo de enzimas digestivas constituído pela lactase, papaína e a bromelaína. (Gold Nutrition)

## 2.1. Otimização das condições de pré-tratamento

Sendo a  $\beta$ -lactoglobulina a proteína dominante do soro comercial, os procedimentos de pré-tratamento e análise da amostra vão ser muito semelhantes aos utilizados no capítulo anterior.<sup>13,14,28,118</sup> Torna-se necessário, mais uma vez, proceder-se ao aquecimento da solução de soro comercial, assim como o acerto de pH.<sup>12,38,105–108</sup> O aquecimento promove a desnaturação das proteínas, principalmente a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La, tornando possível a reticulação pela transglutaminase.<sup>16,72,105–108</sup> O acerto de pH torna-se necessário uma vez que o pH ótimo de ação da enzima, transglutaminase, é 7.<sup>18,72,105–108</sup>

Realizou-se um estudo das diferentes condições de pré-tratamento da solução de soro comercial em H<sub>2</sub>O a 10%:

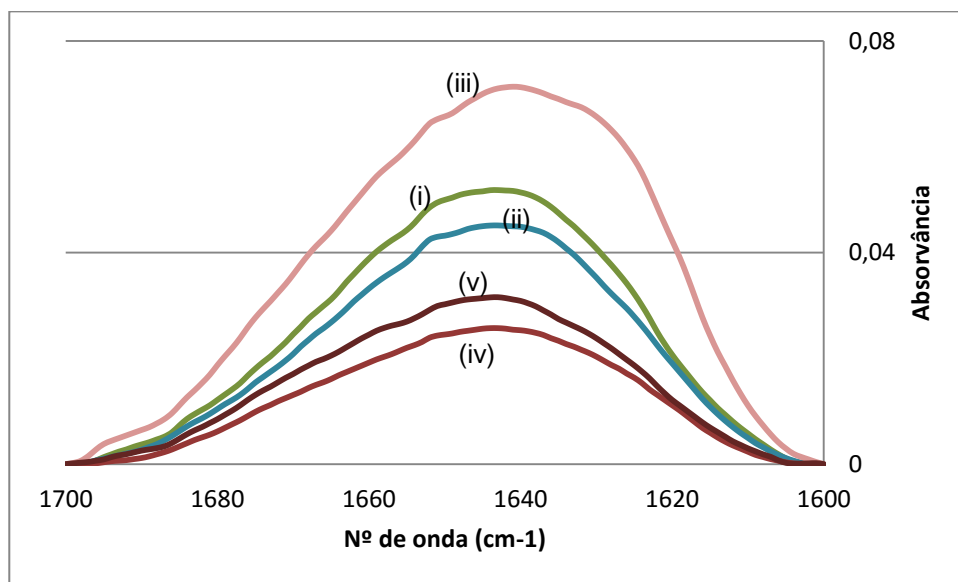
- i. sem aquecimento e sem acerto de pH;
- ii. sem aquecimento e com acerto de pH;
- iii. com aquecimento e sem acerto de pH;
- iv. com aquecimento seguido de acerto de pH;
- v. com acerto de pH seguido de aquecimento;

onde o aquecimento é realizado em banho maria a 80°C durante 1h e o pH é acertado a 7, sendo que o pH inicial do soro comercial é inferior a 7.<sup>18,35,72,80,105–110</sup> Com este estudo, pretende-se verificar em qual das diferentes condições de pré-tratamento existe uma maior desnaturação das proteínas em solução de forma a aumentar a eficiência da reação de reticulação pela transglutaminase.

### 2.1.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

Procedeu-se à análise das diferentes condições de soro comercial em D<sub>2</sub>O a 9%, recorrendo à espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier, FTIR, nas janelas de 1700 a 1600 cm<sup>-1</sup> e 3100 a 2800 cm<sup>-1</sup>, correspondente à região de amida I (figura III.27 e tabelas 0.32 a 0.36 em anexo) e amida A e B (figura 5 e tabelas 0.37 a 0.41 em anexo), respetivamente.<sup>16,39,42,72,91,93,97</sup> A região de amida I dá-nos informação sobre as estruturas

secundárias da proteína, como as folhas- $\beta$ , hélices- $\alpha$  e *random coil*.<sup>39,72,93,97,98</sup> A região de absorção de amida A e B inclui os modos de estiramento C-H,  $sp^3$ ,  $sp^2$  e  $sp$ , dos vários grupos C-H nas cadeias laterais dos aminoácidos constituintes das proteínas ou péptidos em estudo.<sup>72,93</sup>



**Figura III.27:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, das amostras de soro comercial a 9% nas cinco condições de pré-tratamento. **Legenda:** a verde na condição (i) sem aquecimento sem acerto de pH; a azul ciano na condição (ii) sem aquecimento com acerto de pH; a vermelho claro na condição (iii) com aquecimento sem acerto de pH; a vermelho na condição (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH; a vermelho-escuro na condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Analisando as variações de intensidade dos espectros de FTIR na região de amida I relativos às diferentes condições de pré-tratamento em estudo, comparando as condições de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH e (iii) com aquecimento sem acerto de pH, figura III.27, verifica-se que, quando se faz o aquecimento a 80°C da amostra, há um aumento da intensidade e um deslocamento do espectro para a direita, correspondendo a uma diminuição dos valores de energia das vibrações amida I.

Quando se compara a condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH com a condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, figura III.27, regista-se uma diminuição da intensidade do espectro quando a amostra é exposta a temperaturas elevadas.

Relativamente ao acerto de pH das amostras de soro comercial a 9%, verifica-se que, quando se compram as condições de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH e (ii) sem aquecimento com acerto de pH, figura III.27, não há variações no deslocamento do espectro e que há uma diminuição da intensidade do mesmo.

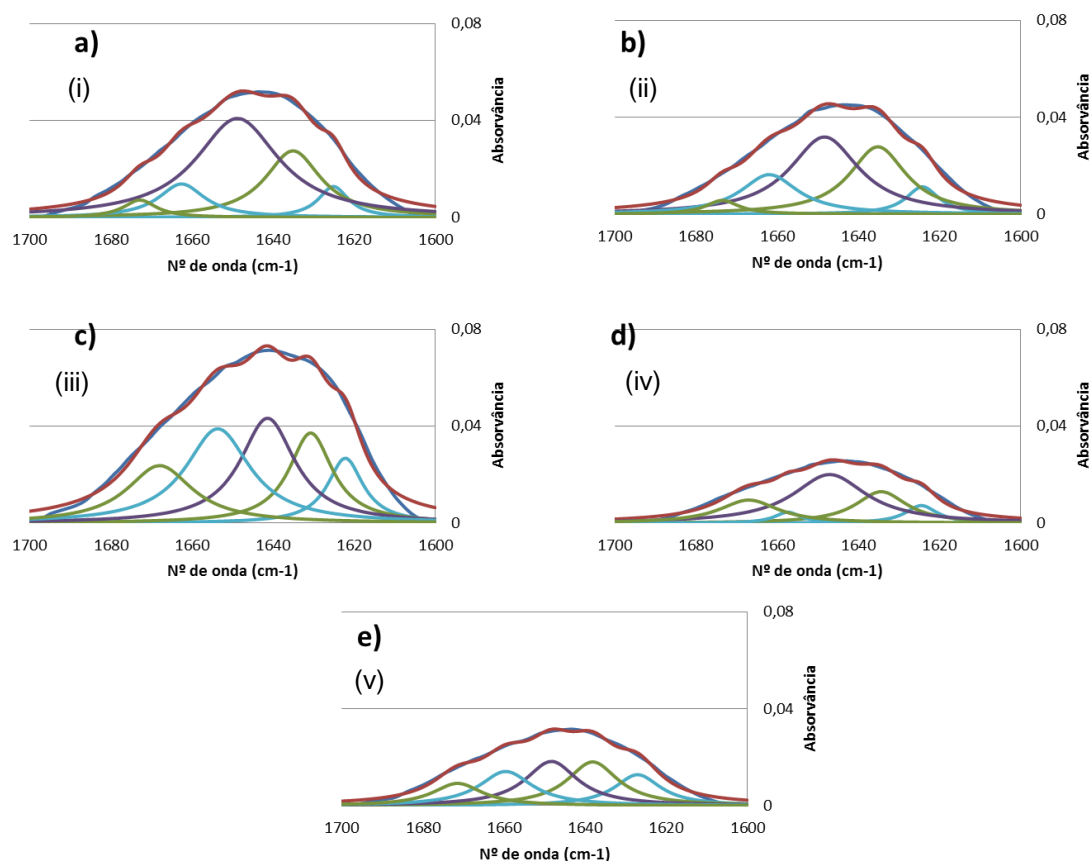
Comparando a condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH com a condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguida de aquecimento, figura III.27,

verifica-se que, quando se sujeita a amostra ao acerto de pH, há um ligeiro deslocamento do espectro para a esquerda e uma diminuição da intensidade do mesmo.

Quando se comparam as condições de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH e (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, figura III.27, verifica-se que, com o acerto de pH há um deslocamento do espectro para a esquerda assim como uma diminuição da sua intensidade.

Por último, quando se compara as diferenças do acerto de pH antes e depois do aquecimento, condições de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento da amostra e (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, figura III.27, verifica-se que quando se faz o acerto de pH depois do aquecimento da amostra há um ligeiro deslocamento do espectro para a direita e uma diminuição da intensidade do mesmo.

A desconvolução dos espectros de FTIR é essencial para se analisar as alterações provocadas pelo aquecimento e o acerto de pH nas diferentes condições de pré-tratamento. A desconvolução dos espectros de FTIR é feita através da aplicação de tratamentos matemáticos, pelo programa *PeakFit v4.12*, figura III.28, onde se subtraiu a linha de base dos espectros e se procedeu à análise espectral através da soma de bandas Lorentzianas. Estas foram inseridas manualmente, e posteriormente ajustadas, com base na pesquisa realizada por Eissa<sup>72</sup>.



**Figura III.28:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na janela 1700 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ , desconvolvido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro comercial em  $\text{D}_2\text{O}$  a 9% nas cinco condições de pré-tratamento. **a)** Sem aquecimento sem acerto de pH (i). **b)** Sem aquecimento com acerto de pH (ii). **c)** Com aquecimento sem acerto de pH (iii). **d)** Com aquecimento seguido do acerto de pH (iv). **e)** Com acerto de pH seguido de aquecimento (v). **Legenda:** a azul-escuro é o espectro observado; a vermelho é o espectro desconvolvido; a azul ciano encontram-se as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intermoleculares; a verde as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intramoleculares; a roxo a banda correspondente às hélices- $\alpha$ .

A atribuição das estruturas secundárias em solução às respetivas bandas foi consoante o estudo realizado e indicado na tabela III.1 e figura III.3, relatado na secção anterior.

#### 2.1.1.1. Efeito do aquecimento nas condições de pré-tratamento

Comparando as condições de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH, figura III.28 (a), e (iii) com aquecimento sem acerto de pH, figura III.28 (c), verifica-se que, com o aquecimento da amostra, existe uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1631\text{cm}^{-1}$  e das hélices- $\alpha$ , a  $1641\text{cm}^{-1}$ . Observa-se também, um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas e antiparalelas, a  $1622\text{cm}^{-1}$  e  $1653\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, e um aumento da influência das folhas- $\beta$  intramoleculares antiparalelas, a  $1667\text{cm}^{-1}$ . (tabela 0.32 e 0.34 em anexo)

Quando se compara a condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH, figura III.28 (b), com a condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, figura III.28 (e), regista-se, com o aquecimento da amostra um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas, a  $1627\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intermoleculares

antiparalelas, a  $1659\text{cm}^{-1}$  e um aumento das folhas- $\beta$  intramoleculares antiparalelas, a  $1671\text{cm}^{-1}$ ; uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1638\text{cm}^{-1}$ , e das hélices- $\alpha$ , a  $1648\text{cm}^{-1}$ . (tabelas 0.33 e 0.36 em anexo)

#### 2.1.1.2. Efeito do pH nas condições de pré-tratamento

Relativamente ao acerto de pH das amostras de soro comercial a 9%, verifica-se que, quando se compram as condições de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH, figura III.28 (a), e (ii) sem aquecimento com acerto de pH, figura III.28 (b), um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas, a  $1626\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1637\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas, a  $1660\text{cm}^{-1}$  e uma diminuição das folhas- $\beta$  intramoleculares antiparalelas, a  $1672\text{cm}^{-1}$ . Há ainda uma diminuição da influência das hélices- $\alpha$ , a  $1649\text{cm}^{-1}$ . (tabelas 0.32 e 0.33 em anexo)

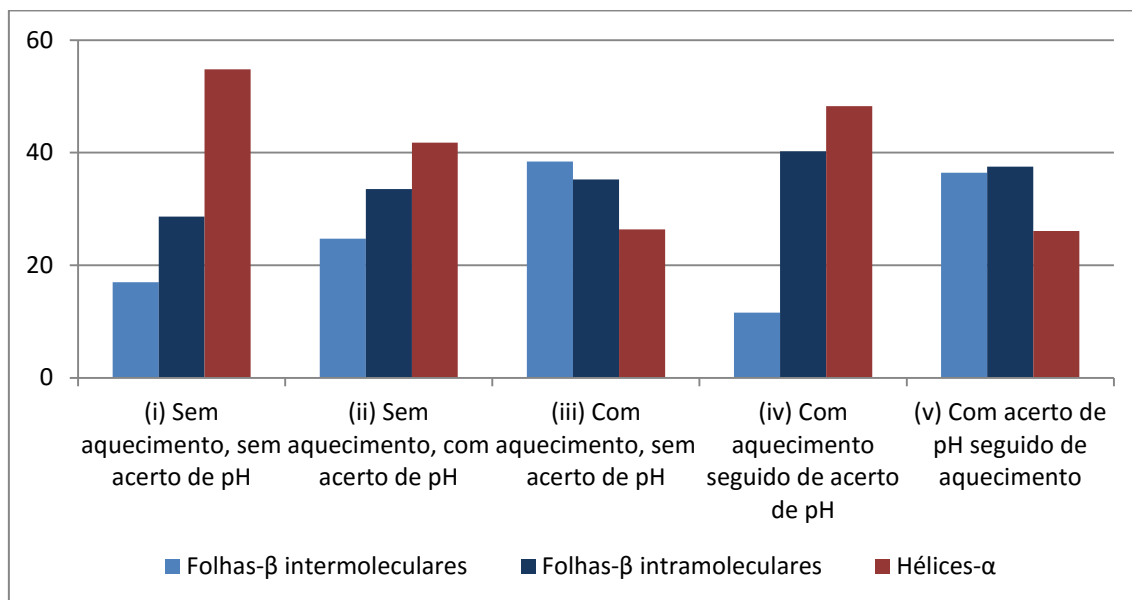
Comparando a condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH, figura III.28 (c), com a condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguida de aquecimento, figura III.28 (e), verifica-se que, com o acerto de pH existe um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas, a  $1627\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1638\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se também uma diminuição da influência das hélices- $\alpha$ , a  $1648\text{cm}^{-1}$ , das folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas, a  $1659\text{cm}^{-1}$  e das folhas- $\beta$  intramoleculares antiparalelas, a  $1671\text{cm}^{-1}$ . (tabela 0.34 e 0.36 em anexo)

Quando se comparam as condições de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH, figura III.28 (c), e (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, figura III.28 (d), verifica-se que, com o acerto de pH existe uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares paralelas, a  $1626\text{cm}^{-1}$  e das folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas, a  $1659\text{cm}^{-1}$ . Verifica-se também um aumento da influência das folhas- $\beta$  intramoleculares paralelas, a  $1636\text{cm}^{-1}$ , das hélices- $\alpha$ , a  $1648\text{cm}^{-1}$ , e das folhas- $\beta$  intramoleculares antiparalelas, a  $1665\text{cm}^{-1}$ . (tabelas 0.34 e 0.35 em anexo)

Por último, quando se compara as diferenças do acerto de pH antes e depois do aquecimento, condições de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento da amostra, figura III.28 (e), e (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, figura III.28 (d), verifica-se que quando se faz o acerto de pH depois do aquecimento da amostra, existe uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares paralelas, a  $1626\text{cm}^{-1}$  e a  $1636\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, e das folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas, a  $1657\text{cm}^{-1}$ . Há ainda um aumento da influência das hélices- $\alpha$ , a  $1648\text{cm}^{-1}$ , e das folhas- $\beta$  intramoleculares antiparalelas, a  $1665\text{cm}^{-1}$ . (tabelas 0.35 e 0.36 em anexo)

### 2.1.1.3. Estudo da desnaturação da amostra de soro comercial nas diferentes condições de pré-tratamento

De forma a complementar a informação obtida até agora, calcularam-se os somatórios das áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  intermoleculares e das folhas- $\beta$  intramoleculares, figura III.29 e tabelas 0.32 a 0.36 em anexo.



**Figura III.29:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial em D<sub>2</sub>O a 9%, nas diferentes condições de pré-tratamento, na região de amida I.

À semelhança do que acontece quando se estuda a  $\beta$ -Lg pura, no caso do soro comercial, o aquecimento das proteínas provoca alterações a nível das estruturas secundárias, há a diminuição das hélices- $\alpha$  uma vez que o aquecimento provoca a perda estrutura nativa e consequentemente a quebra das estruturas secundárias, sendo um indicativo da desnaturação proteica.<sup>40,72,95,97</sup> Ocorre ainda o aumento de folhas- $\beta$  intermoleculares uma vez que, durante o aquecimento do soro comercial, a temperaturas superiores a 70°C, as proteínas agrupam-se e estabelecem ligações entre si, diferentes das ligações existentes antes do aquecimento, levando à formação de agregados.<sup>39,42,72,91,95,97</sup>

No caso das folhas- $\beta$  intramoleculares, quando sujeitas a temperaturas elevadas, são quebradas permitindo a formação de ligações de hidrogénio intermoleculares.<sup>39,42,72,91,95,97</sup>

Analisando os resultados obtidos, verifica-se que o aquecimento da amostra promove a desnaturação das proteínas, isto é, observa-se um aumento de folhas- $\beta$  intermoleculares antiparalelas e paralelas, figura III.29.<sup>39,40,42,72,83,91,93,95,97,98</sup> O somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares é superior ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares, figuras III.3, que corresponde ao encontrado por Eissa.<sup>72</sup>, sendo então indicativo de desnaturação proteica.<sup>39,40,42,83,91,93,95,97,98</sup>

Na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH, figura III.28 (b) e figura III.29, regista-se um aumento do somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares em relação às folhas- $\beta$  intermoleculares. Podemos concluir que, sem o aquecimento da amostra a 80°C, não ocorre a desnaturação das proteínas do soro de leite em solução.<sup>39,40,42,72,83,91,93,95,97,98</sup> (tabela 0.33 em anexo)

Na condição (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, figura III.28 (d) e figura III.29, o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares é muito superior ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares, indicando que existe menos desnaturação proteica, quando comparada com as restantes condições em que amostra foi sujeita ao aquecimento, (iii) e (iv), figura III.29.<sup>39,40,42,72,83,91,93,95,97,98</sup> (tabela 0.35 em anexo)

Na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, figura III.28 (e) e figura III.29, o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares é ligeiramente superior ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares, indicando, que neste caso, há menos desnaturação proteica do que na condição de pré-tratamento em que a amostra é apenas sujeita ao aquecimento (iii).<sup>39,40,42,72,83,91,93,95,97,98</sup> (tabela 0.36 em anexo)

Analisando agora as hélices- $\alpha$ , verifica-se que, com o aquecimento da amostra, há uma diminuição das suas áreas analíticas, figura III.29, o que nos indica que ocorreu desnaturação proteica.<sup>42,59,72,95</sup> Na condição de pré-tratamento (iv), com aquecimento seguido de acerto de pH figura III.28 (d) e figura III.29, o valor das áreas analíticas das hélices- $\alpha$  aumenta, o que vem provar, que neste pré-tratamento, a desnaturação é menos eficiente relativamente à condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH. Já na condição em que se acerta o pH antes do aquecimento (v), figuras III.28 (e) e figura III.29, há uma diminuição das áreas analíticas das hélices- $\alpha$ , indicando que o acerto de pH antes do aquecimento leva a um processo de desnaturação térmica mais eficiente.<sup>39,40,42,72,83,91,93,95,97,98</sup> (tabelas 0.35 e 0.36 em anexo)

Pode-se concluir então, que o aquecimento da solução de soro de leite comercial provoca a desnaturação proteica. Por outro lado, o acerto de pH a 7, que é necessário para a TG se encontrar ativa, atenua de algum modo o efeito desnaturante do aquecimento uma vez que as amostras que foram sujeitas ao aquecimento e ao acerto de pH, (iv) e (v), apresentam uma desnaturação inferior à desnaturação provocada só pelo aquecimento, condição de pré-tratamento (iii), conforme explicado no parágrafo anterior.<sup>39,40,42,72,83,91,93,95,97,98</sup> (tabelas 0.35 e 0.36 em anexo)

Quando se comparam as condições de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, figura III.28 (d), e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, figura III.28 (e), verifica-se que, com o acerto de pH depois do aquecimento, o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intramoleculares é 4 vezes superior ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  intermoleculares, o que significa que, existe mais desnaturação proteica.<sup>39,40,42,72,83,91,93,95,97,98</sup> (tabela 0.35 e 0.36 em anexo)



Em suma, a melhor condição de pré-tratamento é a (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, figura III.28 (d). Pois, apesar de o acerto do pH reduzir a desnaturação proteica, esta continua a ocorrer e o acerto de pH é necessário para a TG atue, provocando reticulação das proteínas do soro.

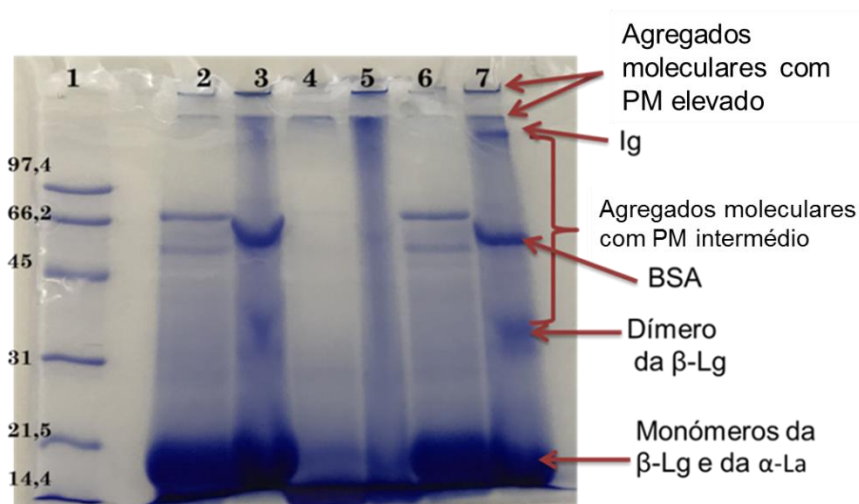
### 2.1.2. Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

A fim de complementar e suportar as conclusões anteriores, procedeu-se à análise da mesma solução de soro comercial, nas cinco condições de pré-tratamento, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, SDS-PAGE, figura III.30 e figura III.31.

As amostras foram preparadas com e sem a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me). Este agente redutor causa a redução das pontes dissulfureto que são responsáveis pela estrutura nativa da proteína, assim, ocorre a destruição das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas.<sup>116,117</sup>

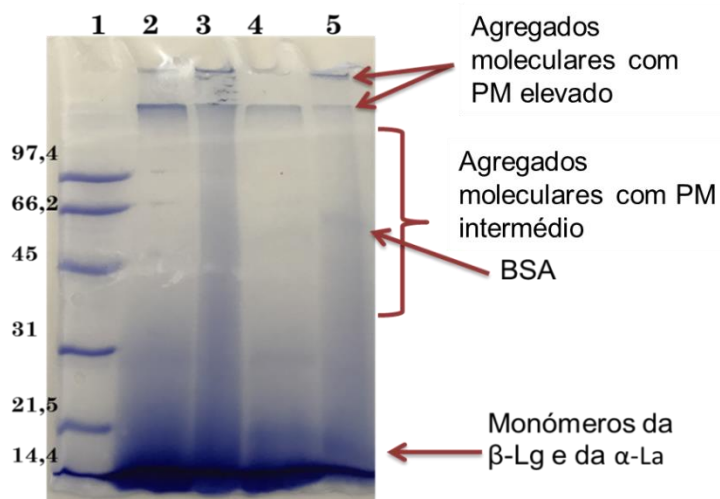
Ao apresentar estas características, o  $\beta$ -Me, é utilizado em análises de proteínas, como é o caso da eletroforese em géis de poliacrilamida, em que é necessário garantir a presença de moléculas proteicas monoméricas em vez de dímeros, tetrâmeros ou oligómeros de ordem superiores, que sejam ligados através de pontes dissulfureto. Para além disso, o seu grupo hidroxilo confere solubilidade em água às proteínas.<sup>116,117</sup>

Neste caso de estudo, o  $\beta$ -Me foi utilizado como reagente de dissociação para obter a degradação de co-agregados possivelmente formados por interações dissulfureto.<sup>116</sup>



**Figura III.30:** Gel de poliacrilamida a 12%. Soro comercial a 10%, diluído para 30mg/mL, em diferentes condições de pré-tratamento. **Poços 2,4 e 6:** com adição de  $\beta$ -Me. **Poços 3, 5 e 7:** sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** Marcador de PM Low range da BioRad; **Poço 2 e 3:** (i) sem aquecimento sem acerto de pH; **Poço 4 e 5:** (iii) com aquecimento sem acerto de pH; **Poço 6 e 7:** (ii) sem aquecimento com acerto de pH.





**Figura III.31:** Gel de poliacrilamida a 12%. Soro comercial a 10%, diluído para 30mg/mL, em diferentes condições de pré-tratamento. **Poços 2 e 4:** com adição de  $\beta$ -Me. **Poços 3 e 5:** sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** Marcador de pesos moleculares *Low range da BioRad*; **Poço 2 e 3:** (v) com acerto de pH seguido de aquecimento; **Poço 4 e 5:** (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Fazendo em primeiro uma análise relativa à nossa proteína em estudo, verifica-se que em todas as amostras se vê a banda correspondente ao monómero da  $\beta$ -lactoglobulina a  $18,4\text{kDa}$ <sup>33,73,108,109,116</sup> (figura III.30 e figura III.31). Nas amostras que não foram sujeitas ao aquecimento (figura III.30, poços 2, 3, 6 e 7) as bandas do monómero são muito mais intensas do que nas restantes (figura III.30 e figura III.31). O facto da banda correspondente ao monómero apresentar uma intensidade mais baixa nas amostras sujeitas ao aquecimento térmico indica que houve desnaturação da proteína uma vez que, ao haver desnaturação, as proteínas têm tendência a formar agregados, deixando de aparecer na forma de monómero.<sup>73,108</sup> Nestas mesmas amostras (figura III.30, poços 2, 3, 6 e 7), verifica-se também a existência de uma banda a  $36,8\text{kDa}$ <sup>73,109</sup>, correspondente ao dímero da proteína.

Nas amostras em que se fez o aquecimento e o acerto de pH (figura III.31), não se deteta a banda correspondente ao dímero das proteínas,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, mas existe retenção de amostra nos poços, podendo indicar a presença de agregados formados pela desnaturação, assim como um arrastamento ao longo da pista que pode corresponder a agregados de pesos moleculares intermédios.<sup>33,73,108,109,116</sup> A banda correspondente ao monómero,  $18,4\text{kDa}$ <sup>33,73,108,109,116</sup>, é a menos intensa de todas as amostras (figura III.30 e figura III.31), o que vem corroborar a conclusão anterior em como o aquecimento provoca desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina.<sup>73,108</sup>

Nos casos com adição de  $\beta$ -Me, nas amostras sem o aquecimento a  $80^\circ\text{C}$ , (figura III.30, poços 2 e 6) vê-se a banda correspondente ao dímero da  $\beta$ -Lg, a  $38,6\text{kDa}$ , uma banda a  $55\text{kDa}$ , outra banda a  $28\text{kDa}$  que corresponde ao dímero da  $\alpha$ -La e a existência de uma mancha no fim do gel que pode corresponder aos monómeros da  $\beta$ -Lg ( $18,4\text{kDa}$ ) e da  $\alpha$ -lactoalbumina ( $14\text{kDa}$ ).<sup>33,116,124</sup> Nos casos sem adição de  $\beta$ -Me, também sem o aquecimento da amostra, (figura III.30, poços 3 e 7) verifica-se a existência de uma banda correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg ( $18,4\text{kDa}$ ) e da  $\alpha$ -La ( $14\text{kDa}$ ) e de uma banda a  $55\text{kDa}$ , que pode corresponder à BSA parcialmente hidrolisada, em ambos os casos.<sup>33,107,108,116,124</sup>

Em todas as amostras em que não se adicionou  $\beta$ -Me (figura III.30, poços 3, 5 e 7; figura III.31, poços 3 e 5) existe arrastamento da amostra por toda a pista, que corresponde à existência de agregados proteicos de pesos moleculares intermédios, e há uma banda, a aproximadamente 36,8kDa, nas amostras sem aquecimento, figura III.30 poços 3 e 7, que corresponde ao dímero da  $\beta$ -Lg.<sup>73,108–110</sup>

Em todas as amostras, figura III.30 e figura III.31, observa-se uma banda no topo do gel que pode corresponder a constituintes não proteicos do soro que se associam às proteínas do soro.<sup>73,109,110,116</sup> Também podem corresponder às imunoglobulinas (144kDa), assim como aos dímeros da lactoferrina e lactoperoxidase (a aproximadamente 160kDa e 155kDa, respetivamente).<sup>3,4,13,28</sup> Nas amostras que foram sujeitas ao aquecimento e ao acerto do pH (pH 7), figura III.31, a intensidade das bandas é menor, neste caso, e como foi referido no ponto anterior na análise por FTIR, é onde o soro comercial apresenta maior desnaturação da amostra. Neste caso, a proteína desnaturada criou um agregado que, devido à grande quantidade de proteínas em solução, pode não ter reagido com o  $\beta$ -Me previamente adicionado, não tendo sido possível pipetar para adicionar aos poços do gel.<sup>35,105,109</sup>

O aparecimento dos agregados proteicos e dos dímeros em todas as amostras que não foram sujeitas ao poder redutor do  $\beta$ -Me acontece porque não houve a quebra das pontes dissulfureto responsáveis pela formação dos dímeros e agregados da  $\beta$ -lactoglobulina.<sup>116,117</sup>

Em suma, o aquecimento provoca a desnaturação da  $\beta$ -lactoglobulina e as melhores condições de pré-tratamento, que contém o pH necessário à ação da TG, são as condições a que se sujeita a amostra ao aquecimento e ao acerto de pH:

- vi. com aquecimento seguido de acerto de pH;
- vii. com acerto de pH seguido de aquecimento.

Aqui surge mais uma condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, que vem complementar as conclusões obtidas pela espectroscopia de FTIR que indicava que a melhor condição de pré tratamento era a condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

### 2.1.3. Análise do efeito das frações azotadas na proteólise

A proteólise é um fenómeno bioquímico que afeta o desempenho funcional das proteínas. Uma vez que o soro de leite é altamente rico em proteínas, e dada a sua elevada importância a nível biológico e funcional, é importante conseguir monitorizar o grau de proteólise ao longo dos tratamentos aplicados ao soro em estudo.<sup>21,103,125</sup>

Os principais agentes proteolíticos são enzimas que podem ter origem no próprio leite, como é o caso da plasmina, proteinase principal do leite, que consegue sobreviver às temperaturas de pasteurização, havendo ainda outras proteínas derivadas da microflora natural do leite.<sup>21,103</sup>

O azoto total, tabela III.2, foi determinado através do método de Kjeldahl onde se admitiu que todo o azoto em solução se encontra na forma proteica. O valor obtido foi convertido em

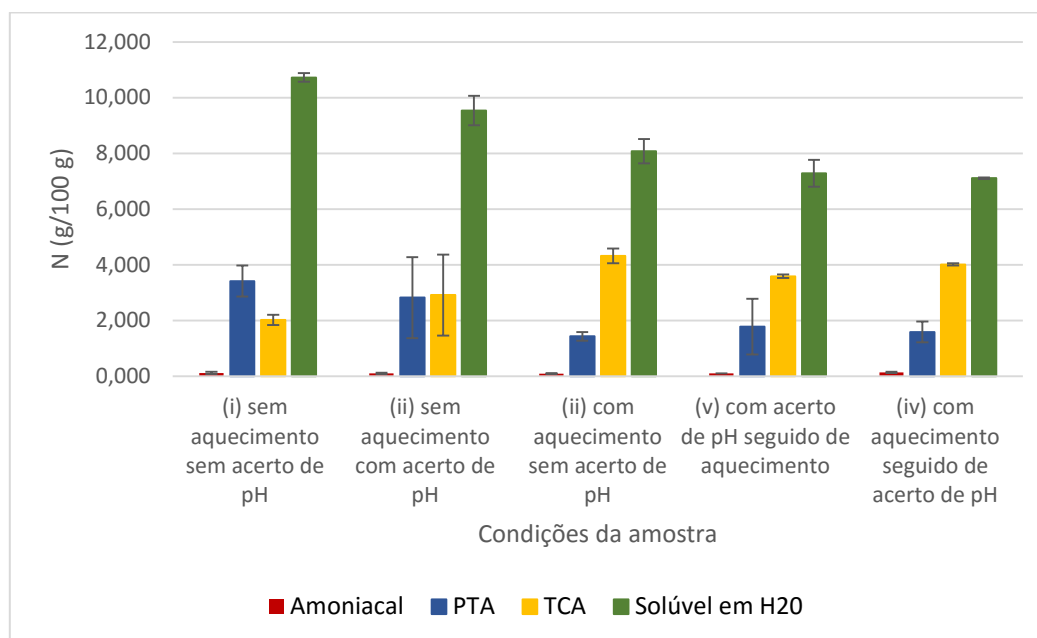
proteína bruta através da aplicação do fator de conversão 6.38, conforme disposto na IDF 25:2008.<sup>21,103</sup>

**Tabela III.2:** Valores médios e desvio padrão correspondentes ao azoto total e quantidade de proteína em solução de soro comercial.

	Azoto Total (g/100g)	Proteína (g/100g)	Média da proteína (g/100g)	Desvio padrão	Proteína indicada no rótulo (g/100g)
Soro comercial amostra 1	12,9	81	76	5	76
Soro comercial amostra 2	11,3	71			

A quantidade de proteína na amostra foi calculada através da amostra de soro comercial, onde, através da determinação do azoto total em solução, se obteve um valor experimental, 76g de proteína/100g de amostra de soro comercial (tabela III.2), igual à quantidade de proteína indicada pelo fabricante *Total Whey* da *Gold Nutrition*.

Posteriormente, procedeu-se à determinação e cálculo das frações de azoto correspondentes ao azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em TCA 12%, ou azoto não proteico (TCASN), azoto solúvel em PTA 5%, ou azoto aminoacídico (PTASN), e azoto amoniacal (NH<sub>3</sub>), conforme indicado na figura III.32.



**Figura III.32:** Valores médios e desvio padrão correspondentes para o azoto amoniacal, azoto solúvel em PTA 5%, azoto solúvel em TCA 12% e azoto solúvel em água, obtidos nas amostras de soro comercial nas diferentes condições de pré-tratamento em estudo.

A medição dos diferentes tipos de azoto em solução permite verificar o efeito da desnaturação uma vez que, através da diminuição do azoto solúvel em água, e consequente

aumento do azoto solúvel em TCA 12%, conseguimos verificar se existe ou não desnaturação da amostra de soro comercial em estudo.<sup>101,103</sup> Isto acontece porque ao haver desnaturação das proteínas, estas perdem a sua estrutura terciária e podem dar origem a péptidos mais pequenos que podem ser detetados pelo azoto solúvel em TCA 12% ou PTA 5%, dependendo do seu peso molecular. (figura III.32)<sup>21,101,103</sup>

Tal como esperado, o azoto amoniacal, que deteta apenas o amoníaco presente na amostra em estudo, é o que apresenta valores menores e é muito inferior em todas as condições em estudo.<sup>103</sup> Por outro lado, o azoto solúvel em água, que deteta as pequenas proteínas, os péptidos, os resíduos de aminoácidos e o amoníaco em solução, apresenta os valores mais elevados de azoto em todas as condições.<sup>103</sup> Isto permite concluir que o azoto solúvel em TCA 12% contém, maioritariamente, péptidos médios e curtos conforme o indicado na literatura, uma vez que os seus valores de azoto são sempre muito inferiores aos valores do azoto solúvel em água. (figura III.32)<sup>21,101,103</sup>

Em todas as condições de pré-tratamento estudadas, com exceção da condição (i) sem aquecimento sem acerto de pH, os valores do azoto solúvel em TCA 12% são sempre superiores aos valores do azoto solúvel em PTA 5%, conforme o indicado por Kuchroo e Fox.<sup>103</sup> O facto de na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH, o valor do azoto solúvel em PTA 5% ser superior ao valor do azoto solúvel em TCA 12%, não é anormal, uma vez que o PTASN só devia detetar os péptidos curtos, assim como os resíduos de aminoácidos e o amoníaco em solução. (figura III.32)<sup>21,101,103</sup>

Verifica-se que todas as amostras que foram sujeitas a um tipo de pré-tratamento, acerto de pH, aquecimento ou ambos, apresentam valores de azoto solúvel em água inferiores e valores de azoto solúvel em PTA 5% e TCA 12% superiores. Onde se regista uma maior diferença destes valores é nas condições de pré-tratamento que foram sujeitas tanto ao aquecimento, 1h a 80°C, como ao acerto de pH, pH=7, sendo que a condição onde a diferença foi mais pronunciada foi na (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH. (figura III.32)<sup>21,101,103</sup> Estes resultados vêm corroborar os resultados obtidos pela técnica de SDS-PAGE e complementar os resultados obtidos na espectroscopia de FTIR.

## **2.2. Estudo da adição de 50U de transglutaminase/g de proteína nas diferentes condições de pré-tratamento**

Devido aos resultados obtidos anteriormente, onde foram seleccionadas duas condições de pré-tratamento. Realizou-se um novo estudo com adição de 50U de TG/g de proteína nas diferentes condições de pré-tratamento da solução de soro comercial em H<sub>2</sub>O a 10%:

- i. sem aquecimento e sem acerto de pH;
- ii. sem aquecimento e com acerto de pH;
- iii. com aquecimento e sem acerto de pH;
- iv. com aquecimento seguido de acerto de pH;
- v. com acerto de pH seguido de aquecimento;

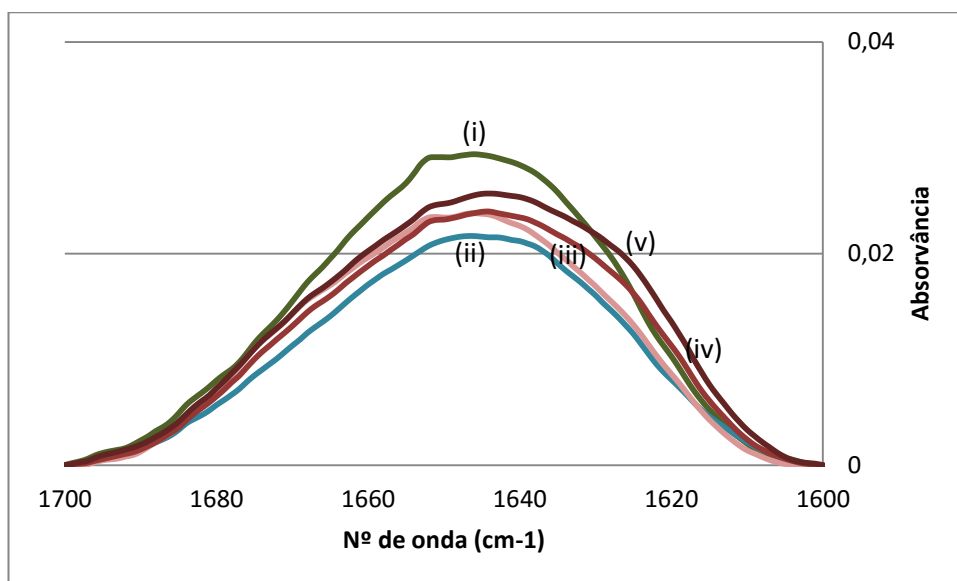
onde o aquecimento é realizado em banho maria a 80°C durante 1h e o pH é acertado a 7, sendo que o pH inicial do soro comercial é inferior a 7.<sup>18,35,72,80,105-110</sup> Posteriormente adiciona-se a TG, e após agitar, vai para a estufa a 50°C durante 12h, uma vez que é a temperatura ótima de ação da enzima e esta se encontra inativa após 12h de reação.<sup>72</sup>

Neste estudo, decidiu-se aumentar a quantidade de TG utilizada, 50U<sup>72,106</sup>, em vez dos 25U de TG usados no estudo realizado apenas para a  $\beta$ -Lg. O aumento da quantidade de TG baseou-se no facto de, no caso do soro comercial, existirem mais proteínas em solução. Sendo assim a TG não atua apenas sobre a  $\beta$ -Lg, como no caso anterior, mas sobre todas as proteínas em solução.<sup>4,14,26,28</sup> A partir deste ponto, todos os resultados obtidos sofrem a influência das restantes proteínas do soro, como é o caso da  $\alpha$ -La que, sendo a segunda maior proteína do soro de leite, compete pela ligação à TG. Para além disso, o ambiente químico em que vai ocorrer a reação de reticulação é diferente.<sup>4,14,26,28</sup> Deste modo, e de forma a tentar balancear todas estas diferenças entre os dois estudos, decidiu-se estudar o efeito da reticulação nas cinco condições de pré-tratamento e não só nas duas anteriormente selecionadas.

Com este estudo, pretende-se verificar em qual das diferentes condições de pré-tratamento existe uma maior reticulação das proteínas em solução pela transglutaminase, e verificar se existe alguma diferença significativa entre as duas condições selecionadas anteriormente.

### **2.2.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier**

Analisaram-se as diferentes condições de soro comercial em D<sub>2</sub>O a 9% com 50U de TG/g de  $\beta$ -Lg, na espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier, FTIR, na região de amida I (figura III.33 e figura 6 e tabelas 0.42 a 0.46 em anexo), janela de 1700cm<sup>-1</sup> a 1600cm<sup>-1</sup>.<sup>16,39,42,72,91,93,97</sup> A região de amida I dá-nos informação sobre as estruturas secundárias da proteína, como as folhas- $\beta$ , hélices- $\alpha$  e *random coil*.<sup>39,72,93,97,98</sup>



**Figura III.33:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína nas cinco condições de pré-tratamento. **Legenda:** a verde na condição (i) sem aquecimento sem acerto de pH; a azul na condição (ii) sem aquecimento com acerto de pH; a vermelho-claro na condição (iii) com aquecimento sem acerto de pH; a vermelho na condição (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH; a vermelho-escuro na condição (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Após a adição de TG e com aquecimento da amostra, comparando as condições de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH (iii) com aquecimento sem acerto de pH, não se verifica uma deslocação do espectro, ou seja, não há alterações significativas nos valores de energia, verifica-se uma diminuição da intensidade, ou seja, uma diminuição dos valores de absorvância. (figura III.33 e tabelas 0.42 e 0.44 em anexo)

Analisando as condições de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH com a condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguida de aquecimento, regista-se, com o aquecimento, um deslocamento do espectro para a direita, ou seja, não há uma diminuição dos valores de energia, e um aumento da intensidade, ou seja, um aumento dos valores de absorvância. (figura III.33 e tabelas 0.43 e 0.46 em anexo)

Relativamente ao acerto de pH, quando se comparam as condições de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH e (ii) sem aquecimento com acerto de pH, verifica-se que quando se faz o acerto de pH não há alterações significativas nos valores de energia, ou seja, não há deslocamento do espectro. Porém, verifica-se uma diminuição da intensidade. (figura III.33 e tabelas 0.42 e 0.43 em anexo)

Comparando agora as condições de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, verifica-se que com o acerto de pH há um aumento da intensidade e um deslocamento do espectro para a direita, ou seja, há uma diminuição dos valores de energia. (figura III.33 e tabelas 0.44 e 0.46 em anexo)

Quando se comparam as condições de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH e (iv) com aquecimento seguido do acerto do pH, não se registam alterações nos valores de intensidade, mas verifica-se que com o acerto de pH há uma deslocação do espectro para a

direita, ou seja, há uma diminuição dos valores de energia. (figura III.33 e tabelas 0.44 e 0.45 em anexo)

Por último, quando se comparam as condições de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento e (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, verifica-se que com o acerto de pH depois do aquecimento não há deslocação do espectro, ou seja, não há variação dos valores de energia. Contudo há uma pequena diminuição dos valores da intensidade. (figura III.33 e tabelas 0.45 e 0.46 em anexo)

A reticulação das proteínas do soro de leite na presença de TG é também estudada na literatura. Os estudos<sup>72</sup> realizados correspondem à interpretação dos espectros obtidos pela técnica de FTIR na região de amida I onde são observadas ligeiras diferenças entre os espectros obtidos antes e após o processo de reticulação, contrariamente às grandes alterações provocadas pela desnaturação térmica.<sup>72</sup>

Quando ocorre a reação de reticulação, o microambiente em torno do grupo carbonilo da cadeia lateral da glutamina que vai reagir com a lisina é alterado, dando origem a alterações na região de amida I. Contudo, o número de novas ligações formadas, que interferem na cadeia central das proteínas, é baixo levando a poucas alterações no espectro de FTIR.<sup>72</sup>

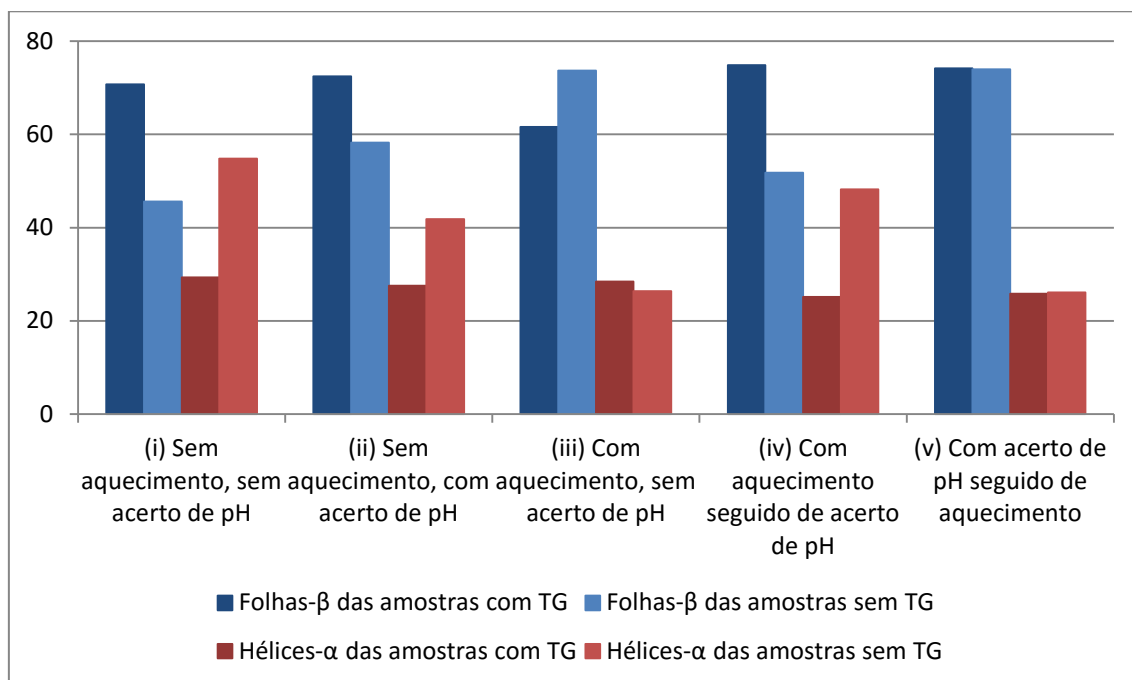
A TG, ao favorecer a formação das ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina, dá origem à formação de ligações intramoleculares, quando a lisina e a glutamina reagem dentro da mesma molécula, ou intermoleculares, quando a reação catalisada pela TG ocorre entre duas moléculas diferentes.<sup>105</sup> Deste modo ocorre a formação de novas ligações de pontes de hidrogénio, que podem ser intermoleculares ou intramoleculares.

Ocorre assim uma reorganização das estruturas secundárias das proteínas provocando um aumento tanto da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares como das folhas- $\beta$  intramoleculares.<sup>72,106,107</sup>

Sendo assim, procedeu-se ao cálculo dos somatórios das áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$ , uma vez que este é suficiente para detetar a ocorrência de reticulação das proteínas do soro comercial pela TG, assim como verificar qual a melhor condição para que tal ocorra.

<sup>72,106,107</sup> Para tal procedeu-se à desconvolução dos espectros de FTIR que consiste na aplicação de tratamentos matemáticos, pelo programa *PeakFit v4.12*, onde se subtraiu a linha de base dos espectros e se procedeu à análise espectral através da soma de bandas Lorentzianas. Estas foram inseridas manualmente, e posteriormente ajustadas, com base na pesquisa realizada por Eissa<sup>72</sup>. A atribuição de cada banda obtida a uma estrutura secundária, folhas- $\beta$  e hélices- $\alpha$ , foi feita com base no estudo realizado *à priori* e representado no esquema da tabela III.1 e figura III.3, na secção anterior. (figura III.34 e tabelas 0.42 a 0.46 em anexo)





**Figura III.34:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial em D<sub>2</sub>O a 9%, sem e com 50U de TG/g de proteína nas cinco condições de pré-tratamento, na região de amida I.

Numa primeira análise, verifica-se a existência de reticulação nas cinco condições estudadas, uma vez que apresentam todas uma quantidade de folhas-β superior, às respetivas condições sem adição de transglutaminase, figura III.34.<sup>39,72,95,97</sup> (tabelas 0.32 a 0.36 e tabelas 0.42 a 0.46 em anexo)

Nas condições com aquecimento, regista-se um aumento das folhas-β, figura III.34, o que vai de encontro ao esperado, uma vez que, quando se aquece a amostra ocorre desnaturação das proteínas permitindo um melhor acesso à TG para esta desempenhar a sua função.<sup>39,72,91,95</sup>

No caso em que se faz o acerto de pH, há efetivamente um aumento das folhas-β, de 58,21 para 72,4, quando comparado com a mesma condição mas sem a adição de TG, figura III.34, indicando que ocorreu reticulação.<sup>39,41,42,59,91</sup> (tabelas 0.33 e 0.43 em anexo)

Relativamente à reticulação enzimática provocada pela TG, verifica-se que nas condições em que se faz o acerto do pH, há um aumento de folhas-β, figura III.34, o que vai de encontro ao descrito na literatura, onde, segundo diversos autores, o aumento global das folhas-β é indicativo de reticulação enzimática.<sup>39,40,42,59,72,91,95,97</sup> Deste modo pode-se provar que, a pH 7, ocorreu reticulação da β-Lg, uma vez que o pH se encontra na gama ótima de funcionamento da enzima, e esta atua melhor.<sup>39,40,42,59,72,91,95</sup> Contrariamente ao que aconteceu no estudo da desnaturação, onde o acerto de pH reduzia a desnaturação proteica, no caso da reticulação pela TG das proteínas do soro, o acerto do pH vai potenciar a reação.<sup>39,41,42,59,91</sup> (tabelas 0.33, 0.35 e 0.36 e tabelas 0.43, 0.45 e 0.46 em anexo)



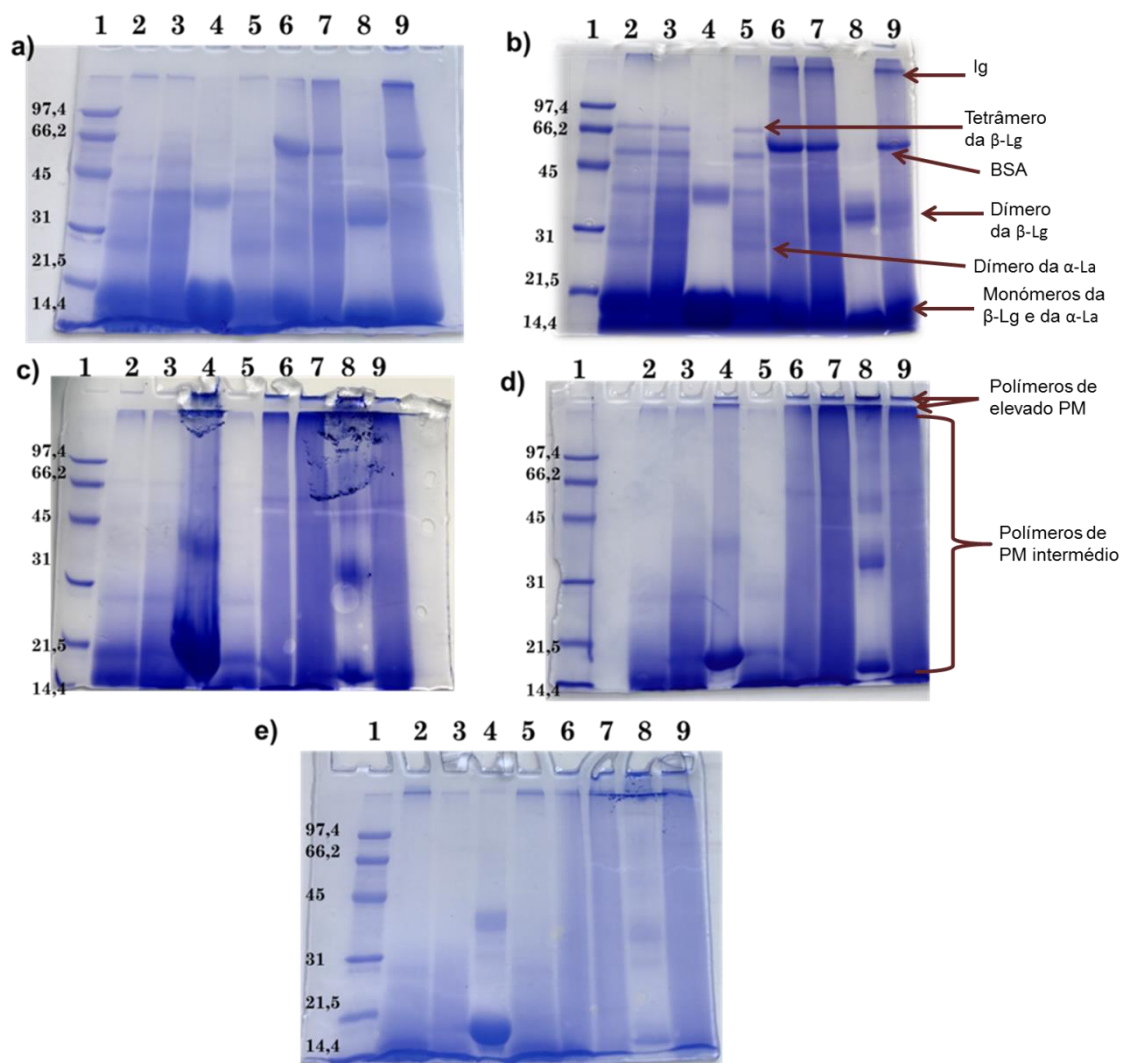
Quando o acerto de pH é feito em conjunto com o aquecimento da amostra, o aumento de todas as folhas- $\beta$  é superior, figura III.34, indicando mais reticulação proteica.<sup>39,40,42,59,72,91,95</sup> (tabelas 0.42 a 0.46 em anexo)

Comparando as condições de pré-tratamento com aquecimento e com o acerto de pH antes e depois do aquecimento, não se registam alterações significativas quanto à influência das folhas- $\beta$  das amostras sujeitas à ação da TG, figura III.34.<sup>39,40,42,59,72,91,95,97</sup> Na condição de pré-tratamento (V) com acerto de pH seguido de aquecimento, quando comparado com a mesma condição mas sem a adição da TG, não há alterações quanto aos valores de folhas- $\beta$  ou de hélices- $\alpha$ , figura III.34. (tabelas 0.45 e 0.46 em anexo) Assim, podemos concluir que a condição onde ocorre mais reticulação é na condição de pré-tratamento onde o acerto de pH é feito depois do aquecimento (iv). Nesta condição é notório o aumento das folhas- $\beta$  e a diminuição das hélices- $\alpha$ , quando comparada com a mesma condição mas sem a adição da TG, figura III.34.<sup>39,40,42,59,72,91,95,97</sup>

### 2.2.2. Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

Com a finalidade de completar as conclusões obtidas anteriormente pela espectroscopia de FTIR, procedeu-se à análise da mesma solução de soro comercial a 10% com 50U de TG/g de proteína, nas cinco condições de pré-tratamento, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, SDS-PAGE, figura III.35.

As amostras foram preparadas, com ou sem a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me). Este agente redutor, para além de causar a redução das pontes dissulfureto que são responsáveis pela estrutura nativa da proteína, permitindo assim que ocorra a destruição das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas, permite também reduzir o peso molecular dos agregados, co-agregados e proteínas de forma a ser possível analisá-los no gel.<sup>116,117</sup>



**Figura III.35:** Gel de poliacrilamida a 12% com as 5 condições de pré-tratamento do soro comercial a 1%, diluído para 30 mg/mL, e de  $\beta$ -lactoglobulina a 5%, diluída para 30 mg/mL. **(a)** (i) sem aquecimento sem acerto de pH; **(b)** (ii) sem aquecimento com acerto de pH; **(c)** (iii) com aquecimento sem acerto de pH; **(d)** (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH; **(e)** com acerto de pH seguido de aquecimento. **Legenda:** Poços 1 a 5: com adição de  $\beta$ -Me. Poços 6 a 9: sem adição de  $\beta$ -Me. Poço 1: marcador de pesos moleculares *Low Range* da *Bio-Rad*. Poço 2 e 6: soro comercial que foi à estufa a 50°C sem adição de TG. Poço 3 e 7: soro comercial com 50U de TG/g de  $\beta$ -lactoglobulina. Poço 4 e 8:  $\beta$ -Lg. Poço 5 e 9: soro comercial.

De forma a simplificar a análise dos géis correspondentes às cinco condições em estudo:

- (i) sem aquecimento sem acerto de pH;
- (ii) sem aquecimento com acerto de pH;
- (iii) com aquecimento sem acerto de pH;
- (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH;
- (v) com acerto de pH seguido de aquecimento;

realizou-se uma análise geral dos poços onde se encontra a amostra na presença de TG, poços 3 e 7, em todos os géis da figura III.35, onde o poço 3 corresponde às amostras com  $\beta$ -Me e o poço 7 às amostras sem  $\beta$ -Me, que pode ser analisada na tabela III.3.

**Tabela III.3:**Correspondência entre a condição de pré-tratamento em estudo com 50U de TG/g de proteína, do soro de queijo comercial, e as bandas relevantes que aparecem nos géis de SDS-PAGE, figura III.35.

Condições	(i)		(ii)		(iii)		(iv)		(v)	
Bandas	Com $\beta$ - Me	Sem $\beta$ - Me	Com $\beta$ - Me	Sem $\beta$ - Me	Com $\beta$ - Me	Sem $\beta$ - Me	Com $\beta$ - Me	Sem $\beta$ - Me	Com $\beta$ - Me	Sem $\beta$ - Me
Retenção nos poços				✓		✓		✓		✓
Polímeros de elevado Peso Molecular	✓	✓		✓		✓		✓		✓
Dímeros da lactoferrina (160kDa) ou lactoperoxidase (155kDa); Imunoglobulinas (144kDa)		✓		✓		✓		✓		✓
Tetrâmero da $\beta$ -Lg (73,6kDa)			✓							
Arrastamento: polímeros ou agregados de pesos moleculares intermédios	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓
BSA ( $\approx$ 55kDa)	✓	✓	✓	✓				✓		
Dímero da $\beta$ -Lg (36,8kDa)	✓		✓							
Dímero da $\alpha$ -La (28kDa)	✓		✓		✓					
Mancha: monómeros da $\beta$ -Lg (18,4kDa) e da $\alpha$ -La (14kDa)	✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓		✓

Analisando o gel correspondente à condição de pré-tratamentos (i) sem aquecimento sem acerto de pH com a adição de 50U de TG/g de proteína do soro, figura III.35 (a) poços 3 e 7, e recorrendo à tabela III.3, podemos verificar que, apesar de não haver qualquer tipo de desnaturação proteica, existe algum tipo de reticulação enzimática devido à presença da banda correspondente aos polímeros de elevado peso molecular, ou às imunoglobulinas, a aproximadamente 144kDa, assim como aos dímeros da lactoferrina e lactoperoxidase, que

aparecem a aproximadamente 160kDa e 155kDa, respetivamente.<sup>4,45,126,127</sup> Denota-se também a presença da banda, pouco intensa, dos dímeros das proteínas dominantes,  $\beta$ -Lg a 36,8kDa e da  $\alpha$ -La a 28kDa, a mancha no fundo da pista correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg, 18,4kDa, e da  $\alpha$ -La, 14kDa, que é menos intensa do que a banda correspondente à proteína pura, poço 4, vindo comprovar a existência de reticulação.<sup>33,72,105,107–110,123</sup>

Fazendo agora uma análise da condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH na presença de TG (figura III.35 (b) e tabela III.3), na amostra em que se adicionou  $\beta$ -Me, poço 3, verifica-se a presença da  $\beta$ -Lg na forma de tetrâmero, 73,6kDa, na forma de dímero, aparecendo uma mancha a 36,8kDa, e, em conjunto com a  $\alpha$ -La, no fim da pista. Nesta análise não há indícios de reticulação, uma vez que as bandas das proteínas são bastante intensas e não há a presença de polímeros de elevado peso molecular no topo do gel.<sup>35,73,116,123</sup>

No caso onde não se adicionou o agente redutor, figura III.35 (b), poço 7 e tabela III.3, deixam de aparecer as bandas correspondentes aos tetrâmeros e dímeros da  $\beta$ -Lg, a 73,6kDa e a 36,8kDa, respetivamente.<sup>73</sup> A mancha correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg, 18,4kDa, e da  $\alpha$ -La, 14kDa, aparece mas menos intensa, sendo já um indicativo de reticulação enzimática.<sup>33,72,105,107–110,123</sup> A confirmar a reticulação pela TG, verifica-se a existência de retenção de amostra no poço do gel, indicando que os polímeros não conseguiram sequer penetrar a rede do gel,<sup>35,109,123</sup> surge também no topo do gel uma banda correspondente aos polímeros de elevado peso molecular, ou às imunoglobulinas, a aproximadamente 144kDa, assim como aos dímeros da lactoferrina e lactoperoxidase, que aparecem a aproximadamente 160kDa e 155kDa, respetivamente.<sup>4,45,126,127</sup> Surge ainda um arrastamento mais intenso, quando comparadas com o estudo realizado com adição de  $\beta$ -Me, poço 3. Este arrastamento intenso ocorre devido à formação de polímeros intermédios, indicativos de reticulação das proteínas pela TG, provocados pela ausência do agente redutor.<sup>108–110,116,123</sup>

Na condição sem acerto de pH com aquecimento, figura III.35 (c) e tabela III.3, as alterações significativas ocorrem no poço onde se encontra a amostra na presença da TG e sem adição de  $\beta$ -Lg, poço 7, verifica-se a presença de uma banda intensa no topo do gel que pode corresponder aos polímeros formados durante a reação de reticulação das proteínas do soro pela TG, assim como às imunoglobulinas (144kDa), e aos dímeros da lactoferrina e lactoperoxidase (160kDa e 155kDa, respetivamente).<sup>4,33,35,45,105,107,110,116,123,126,127</sup> Esta banda é mais intensa do que nas amostras em que não se adicionou a TG, poços 6 e 9 da figura III.35 (c), indicando que houve reticulação enzimática.<sup>108–110,116,123</sup>

A próxima condição de pré-tratamento é a condição (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, figura III.35 (d) e tabela III.3, e analisando os amostras sem adição de  $\beta$ -Me, poço 7, verifica-se um arrastamento na pista do gel, indicando a presença de polímeros de peso molecular intermédio.<sup>108–110,116,123</sup> Existe também alguma retenção de amostra no poço, sendo mais um indicativo de reticulação enzimática uma vez que os polímeros formados pela reação da TG com as proteínas do soro atingiram pesos moleculares que não permitiram a sua entrada na rede do gel.<sup>35,109,123</sup>

Por último, temos a condição de pré-tratamento, (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de TG, figura III.35 (e) e tabela III.3, poços 3 e 7. Verifica-se que, na amostra que reagiu com o  $\beta$ -Me, poço 3, há um arrastamento na pista do gel, indicando a presença de polímeros de peso molecular intermédio.<sup>108-110,116,123</sup>

No caso das amostras onde não se adicionou o agente redutor, poço 7, verifica-se uma diminuição da intensidade da banda do monómero da  $\alpha$ -La (14kDa) e um ligeiro aumento de intensidade da banda do topo do gel, quando comparado com as amostras que não foram sujeitas à presença da TG, poços 6 e 9, o que pode indicar a presença de polímeros de alto peso molecular que surgem com a reticulação.<sup>72,73,105,108-110,123</sup>

Em suma, podemos aferir que as condições onde se verifica uma menor quantidade da banda correspondente aos monómeros das proteínas principais do soro e onde se regista uma maior quantidade de retenção de amostra nos poços e no topo do gel, são as condições de pré-tratamento que foram sujeitas ao aquecimento a 80°C durante 1h e ao acerto do pH (pH=7), (iv) e (v), figura III.35 (d) e (e).<sup>35,72,105,109,110,116,123</sup> Estas conclusões vêm complementar as obtidas pela espectroscopia de FTIR, secção anterior, onde se seccionou a condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH.

### **2.3. Estudo da cinética de reticulação com transglutaminase em condições de pré-tratamento otimizada**

Uma vez confirmada a reticulação das proteínas do soro comercial, mais especificamente da  $\beta$ -lactoglobulina, pela transglutaminase fez-se o estudo cinético da reação.

Realizou-se o estudo cinético nas duas melhores condições de pré-tratamento seleccionadas anteriormente condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH e (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, uma vez que foram, segundo os resultados obtidos por FTIR (figuras III.33 e III.34 e tabelas 0.42 a 0.46 em anexo) e por eletroforese em gel de poliacrilamida (figura III.35 e tabela III.3), foram as condições de pré-tratamento nas quais se obteve uma maior eficácia de reticulação.

A escolha da quantidade de TG a utilizar foi feita tendo em conta o estudo realizado por Veloso<sup>128,129</sup> que consistiu na otimização da quantidade de TG a adicionar ao soro comercial, onde se conclui que, para a condição de pré-tratamento:

- (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, a melhor quantidade de TG é 100U por grama de proteína em solução;
- (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, a melhor quantidade de TG é 50U por grama de proteína em solução.

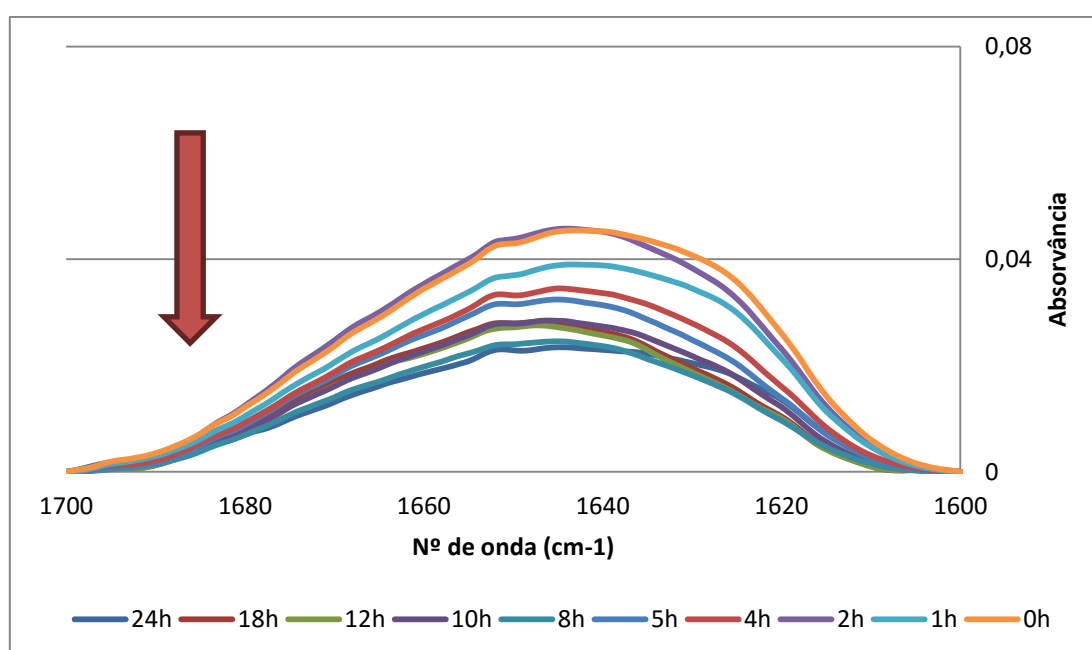
Deste modo, procedeu-se ao estudo cinético com base nestas condições.

#### **2.3.1. Cinética da condição com acerto de pH seguido de aquecimento com 50U de transglutaminase/g de proteína, 24h**

As amostras foram à estufa a 50°C durante 24h, para se ter uma visão global da cinética, uma vez que no soro comercial, e contrariamente ao estudo da proteína pura, há uma maior quantidade de proteínas em solução, e outros componentes não proteicos, que podem interferir na reação de reticulação.

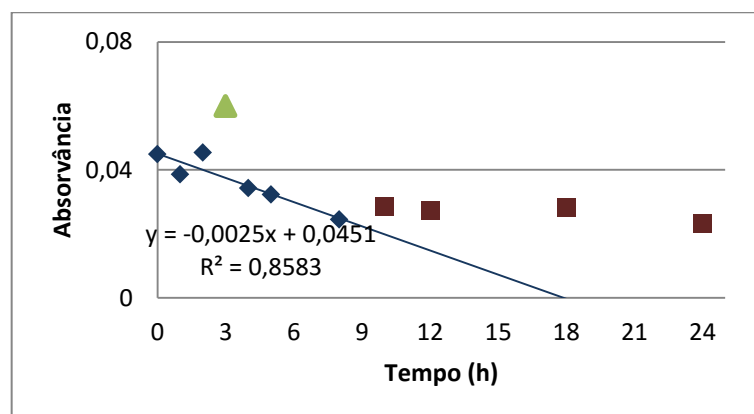
### 2.3.1.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

Numa primeira etapa, recorreu-se à espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR), na região de amida I (figura III.36 e tabela 0.47 em anexo), de forma a proceder ao estudo cinético da adição de 50U de TG/g de proteína.



**Figura III.36:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Pela análise geral dos espectros correspondentes às diferentes horas de cinética, verifica-se que os espectros são muito semelhantes entre si e que de um modo geral há uma diminuição de intensidade ao longo das 24h de análise, figura III.36.

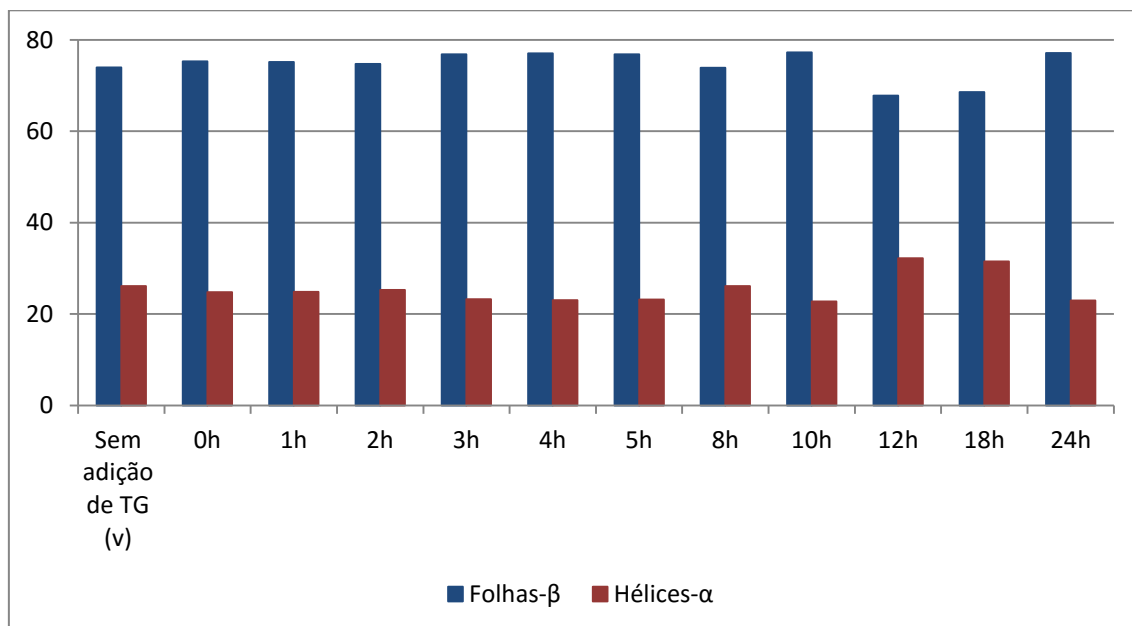


**Figura III.37:** Gráfico com a absorvância a  $1646\text{cm}^{-1}$  ( $n^\circ$  de onda) em função do tempo, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 25U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH. **Legenda:** os quadrados a azul representam as 0h, 1h, 2h, 4h, 5h, 8h, os quadrados a vermelho representam as 10h, 12h, 18h e 24h e o triângulo a verde representa as 3h de reação.

No entanto, quando se analisa o gráfico que representa a absorvância, a  $1646\text{cm}^{-1}$ , das diferentes horas de cinética, verifica-se, efetivamente, uma diminuição dos valores de intensidade nas oito primeiras horas de cinética, figura III.37. A partir da décima hora até à vigésima quarta hora a reação de reticulação mantém-se, não há grandes variações de intensidade. Isto acontece porque a TG fica inativa após 12h de reação<sup>72</sup> deixando de haver reticulação e desta forma não há alterações relevantes na estrutura das proteínas, figura III.37.<sup>4,14,26,28</sup>

Podemos então concluir que a partir das 8h começamos a entrar no patamar da cinética.<sup>72</sup>

De forma a analisar mais detalhadamente os espetros, realizou-se a sua desconvolução através do programa *PeakFit v4.12*, como anteriormente descrito, onde se obtiveram as bandas, e respetivas áreas relativas em percentagem, correspondentes às diferentes estruturas secundárias dos polímeros das proteínas presentes na solução de soro comercial reticulada com TG. Sendo elas as folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares e as hélices- $\alpha$ . (figura III.38 e tabela 0.47 em anexo) Para se obter uma análise mais sucinta e direta, calculou-se o somatório das áreas analíticas relativas de todas as folhas- $\beta$  em solução e das hélices- $\alpha$ , figura III.38 e tabela 0.47 em anexo.



**Figura III.38:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espetros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, na região de amida I.

Iniciando a análise dos dados obtidos pelo somatório das áreas analíticas das estruturas secundárias em solução, figura III.38, denota-se a existência de reticulação enzimática. Em todas as horas do estudo cinético, o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  são ligeiramente superiores aos valores das respetivas áreas analíticas da mesma condição sem adição de transglutaminase, com a exceção das horas 12 e 18 de reação, onde a quantidade de folhas- $\beta$  é inferior figura III.38.<sup>39,72,95,97</sup> Como já foi referido, com a reticulação enzimática as alterações são pouco significativas e é de ter em conta que a TG, ficando inativa após 12 horas de reação, deixa de reticular as proteínas após essa hora.<sup>72</sup> (tabela 0.47 em anexo)

Analisando o comportamento das folhas- $\beta$  ao longo do tempo, verificamos que vão aumentando até às 3h e mantém estável até às 10h de reação, com a exceção da hora 8 onde houve uma diminuição da soma das áreas analíticas, figura III.38. A partir da hora 10h também há uma diminuição destes valores, às 12h e 18h, voltando a aumentar às 24h, figura III.38. (tabela 0.47 em anexo)

O facto de o somatório das folhas- $\beta$  variar pouco ao longo da cinética pode estar relacionado com a grande quantidade de proteínas em solução. A TG apresentando uma maior afinidade com a  $\beta$ -Lg e com a  $\alpha$ -La, sendo estas as proteínas dominantes do soro de leite, 45 a 57% e 15 a 25%, respetivamente, vai reagir logo nas primeiras horas com estas proteínas ocorrendo, praticamente, toda a reação de reticulação.<sup>26,35,72,76,78,80,84</sup> (tabela 0.47 em anexo)

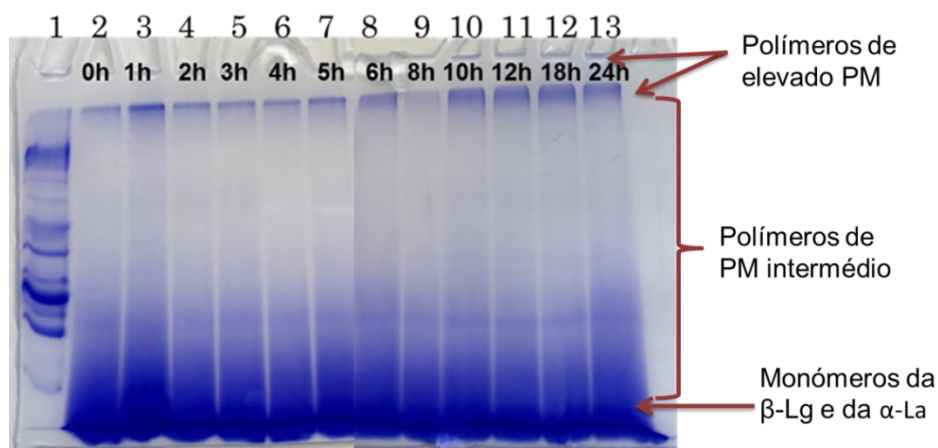
Desta forma podemos admitir que a reação de reticulação ocorre toda nas primeiras horas de reação.<sup>72</sup> Este resultado é confirmado pelo facto de não haver variações significativas nos valores de folhas- $\beta$  e de hélices- $\alpha$  no decorrer da cinética, contudo comprava-se a



existência de reticulação enzimática pelo aumento de folhas- $\beta$  e diminuição de hélices- $\alpha$  quando comparados com o estudo onde não se adicionou TG, capítulo II.1 e tabela 0.36 em anexo.<sup>39,40,72,91,97</sup>

### 2.3.1.2. Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

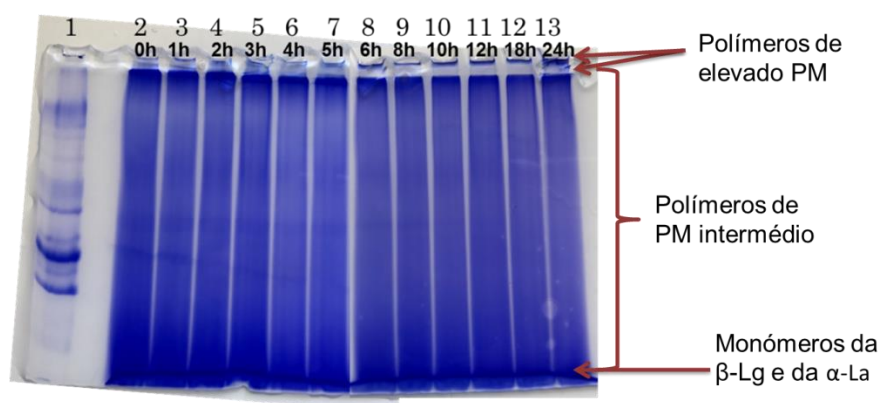
De maneira a suplementar a informação obtida pela espectroscopia de FTIR durante cinética enzimática, realizou-se a eletroforese em géis de poliacrilamida a 12% das amostras com as diferentes horas de cinética da reação de reticulação das proteínas do soro comercial na condições de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento com 50U de TG/g de proteína, com e sem adição de  $\beta$ -Me, figura III.39 e figura III.40, respetivamente.



**Figura III.39:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro comercial com 50U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, com o soro comercial a 10% diluído para 30 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares LMW da NZYTech. **Poço 2 a 13:** soro comercial com TG 50 U/g de proteína no soro e tempos de incubação indicados.

Podemos observar, pela análise do gel de poliacrilamida, com adição de  $\beta$ -Me às amostras de soro comercial na condição (v) com acerto de pH seguido do aquecimento da amostra com adição de 50U de TG/g de proteína, figura III.39, que a transglutaminase funciona, isto é, que ocorreu a reticulação da  $\beta$ -Lg presente no soro comercial. Podemos aferir esta conclusão, uma vez que se formam polímeros de alto peso molecular, apresentando uma banda no topo do gel e há a presença de polímeros de pesos moleculares intermédios, visível pelo arrastamento no gel.<sup>35,72,105,108,109,116,123</sup> Esta banda vai ficando mais evidente à medida que o tempo de reação aumenta sendo que, às 10h horas, figura III.39 poço 10, a intensidade da banda atinge o ponto máximo mantendo-se assim até às 24h, figura III.39 poços 10 a 13.<sup>72,105,110</sup>

Relativamente às bandas correspondentes aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, 18,4kDa e 14kDa, respetivamente, aparecem como uma mancha, no fim do gel, devido à sua elevada concentração no soro, figura III.39.<sup>35,105,108,109</sup> A banda vai diminuindo de intensidade ao longo do tempo, indicando mais uma vez que ocorre a reticulação das proteínas com a TG.<sup>72,105,110</sup>



**Figura III.40:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro comercial com 50U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (v) com acerto de pH seguido de aquecimento, com o soro comercial a 10% diluído para 30 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares LMW da NZYTech. **Poço 2 a 13:** soro comercial com TG 50 U/g de proteína no soro e tempos de incubação indicados.

Procedendo à análise do gel de poliacrilamida, com as mesmas condições em estudo, mas sem a adição de  $\beta$ -Me, figura III.40, verifica-se um arrastamento extenso em todos os pontos temporais de reação.<sup>108–110,116,123</sup> O arrastamento existente no gel, figura III.40, é devido à ausência do agente redutor, como não houve adição de  $\beta$ -Me, os polímeros das proteínas do soro comercial reticuladas não sofreram a redução das suas pontes dissulfureto que são responsáveis pela estrutura nativa da proteína. Assim, não ocorreu a destruição das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas e estas apareceram com diversos pesos moleculares, dando origem ao arrastamento.<sup>109,116,117</sup>

Verifica-se também, que nas primeiras horas de reação, e contrariamente ao esperado (figura III.40 poços 2 a 7), há uma maior intensidade da banda de elevado peso molecular.<sup>72,105,110</sup> Esta elevada intensidade pode corresponder às imunoglobulinas, que aparecem a 144kDa, assim como aos dímeros da lactoferrina e lactoperoxidase, que aparecem a 160kDa e 155kDa, respetivamente.<sup>33,35,73,109,110</sup> Conforme há a diminuição desta banda, há um aumento da quantidade de soro retida nos poços, figura III.40.<sup>72,105,110</sup> Segundo o defendido por vários autores, quando ocorre a reticulação com a TG, formam-se polímeros com um peso molecular tão elevado que não chegam a passar, ou até mesmo a entrar, nos poços.<sup>35,109,123</sup>

Relativamente às bandas correspondentes aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, 18,4kDa e 14kDa, respetivamente, aparecem como uma mancha no final do gel, figura III.40.<sup>33,35,73,109,123</sup> O facto de aparecerem com uma intensidade tão elevada chegando mesmo a ficarem sobrepostas, ocorre devido à elevada concentração no soro comercial destas duas proteínas.<sup>26,28</sup> Conforme a reticulação das proteínas com a TG vai ocorrendo, esta banda, diminui a sua intensidade provando mais uma vez, que a TG reticula a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La, proteínas predominantes do soro, diminuindo assim a sua alergenicidade.<sup>72,105,109,110</sup>

Podemos ainda conferir, pela análise dos dois géis, figura III.39 e figura III.40, que a partir da hora 10 (poço 10 em ambas), não existem alterações quanto ao aspeto das bandas

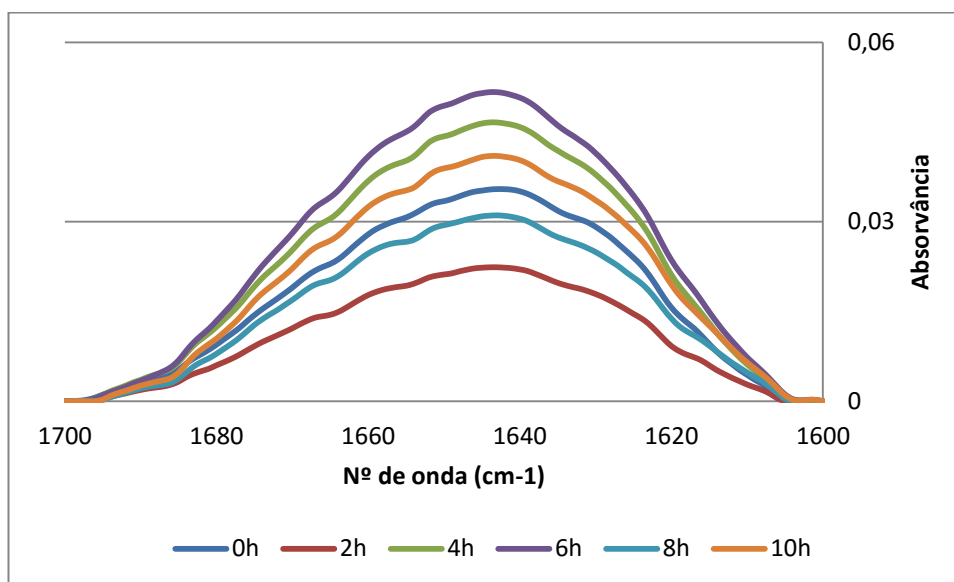
dominantes, no topo e no fim do gel, contudo a reação de reticulação parece ocorrer logo nas horas iniciais de cinética devido à saturação da corrida indicando a presença de polímeros de peso molecular intermédios.<sup>108-110,116,123</sup> Esta observação vem corroborar os resultados obtidos pela técnica de FTIR que indicam que a reação de reticulação ocorre logo na primeira hora, parando nesse ponto temporal.

### 2.3.2. Cinética da condição com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de transglutaminase/g de proteína, 10h

Neste estudo cinético, as amostras de soro comercial com TG, foram à estufa a 50°C durante 10h e foram retiradas alíquotas de 2h em 2h. As 10h de reação foram escolhidas com base nas conclusões retiradas do estudo anterior onde se estudou a reticulação da TG com as proteínas do soro comercial durante 24h.

#### 2.3.2.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

A primeira análise realizada no estudo da cinética do soro comercial com 100U de TG/g de proteína em solução, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, foi realizada recorrendo, mais uma vez, à espectroscopia de FTIR. A região estudada foi a região de Amida I, onde se obtiveram os espectros, relativos às diferentes horas de cinética, apresentados na figura III.41. (tabela 0.48 em anexo)



**Figura III.41:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação de soro comercial a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com aquecimento seguido de acerto de pH.

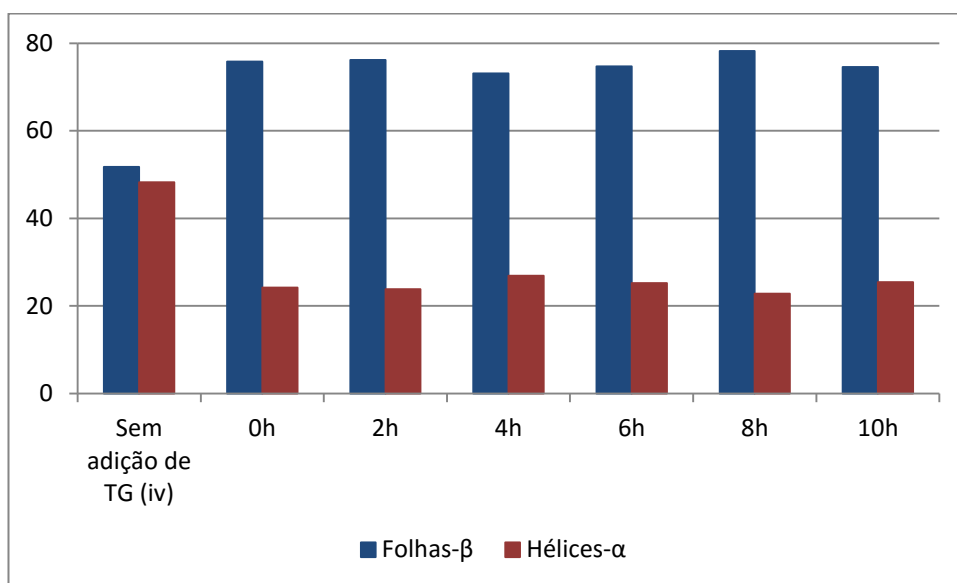
Começando mais uma vez por uma análise global dos espectros, figura III.41, verifica-se que, independentemente das horas de reação, o comportamento é semelhante em todos e não se registam alterações quanto ao deslocamento dos mesmos.

Relativamente à intensidade não se pode retirar, mais uma vez, qualquer tipo de conclusões, uma vez que não apresentam um comportamento tendência. É de referir, contudo, que o espectro com uma maior intensidade corresponde à hora 6 da cinética e o espectro com menos intensidade corresponde à hora dois, figura III.41.

Por último, realizou-se a desconvolução dos espectros obtidos através da espectroscopia de FTIR, através da aplicação de tratamentos matemáticos, recorrendo ao programa *PeakFit v4.12*. (figura III.42 e tabela 0.48 em anexo)

Através do programa referido anteriormente, foi possível obter as bandas, e respetivas áreas relativas em percentagem, correspondentes às diferentes estruturas secundárias dos polímeros das proteínas presentes na solução de soro comercial reticulada com TG. Sendo elas as folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares e as hélices- $\alpha$ . (figura III.42 e tabela 0.48 em anexo)

De forma a obter-se uma análise mais concisa e direta, calculou-se o somatório das áreas analíticas relativas de todas as folhas- $\beta$  em solução e das hélices- $\alpha$ , figura III.42 e tabela 0.48 em anexo.



**Figura III.42:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro comercial a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de ajuste de pH, na região de amida I.

Primeiramente confirma-se a existência da reticulação das proteínas do soro comercial com a TG uma vez que, e comparando com a mesma condição sem a adição de enzima, o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  é superior durante toda a reação de reticulação, figura III.42.<sup>39,72,95,97</sup> (tabelas 35 e 48 em anexo)

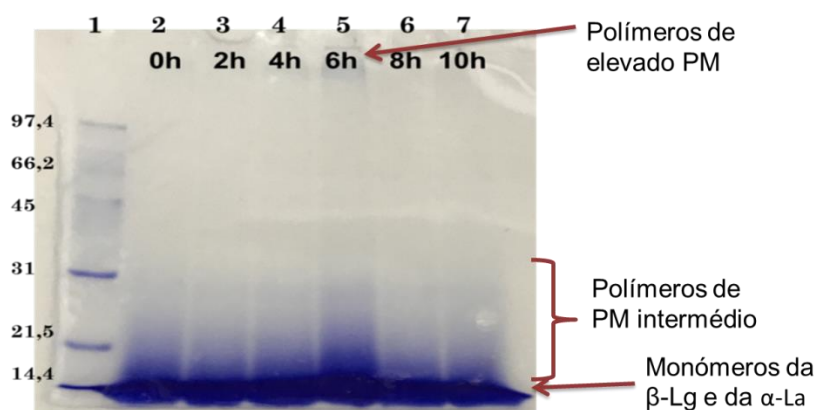
Uma vez confirmada a existência de reticulação, podemos analisar o comportamento geral da reação em estudo. Mais uma vez não se registam alterações significativas nos somatórios das folhas- $\beta$  assim como das hélices- $\alpha$  dando a entender que a reação de

reticulação ocorreu logo no início da cinética. Estando a TG em contanto com uma grande quantidade de proteínas e tendo uma grande afinidade com as proteínas dominantes,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, vai reagir primeiramente com estas entrando logo nas primeiras horas no patamar da cinética.<sup>26,35,72,76,78,80,84</sup> (tabela 0.48 em anexo)

Contudo, verifica-se que o somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$  apresenta, na quarta hora de reação, o seu valor mais baixo. Aqui, volta a aumentar atingindo o máximo à oitava hora, figura III.42.<sup>39,40,72,91,97</sup> (tabela 0.48 em anexo) Apesar das pequenas variações provocadas pela reação de reticulação, podemos indicar que na primeira hora de cinética já ocorreu toda a reação de reticulação.<sup>72</sup>

### 2.3.2.2. Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, foi mais uma vez, usada como técnica de análise para ajudar a definir as condições temporais da reação. Para tal correram-se as amostras referentes às diferentes horas de cinética na presença e na ausência do agente redutor,  $\beta$ -Me, figura III.43 e figura III.44, respetivamente.

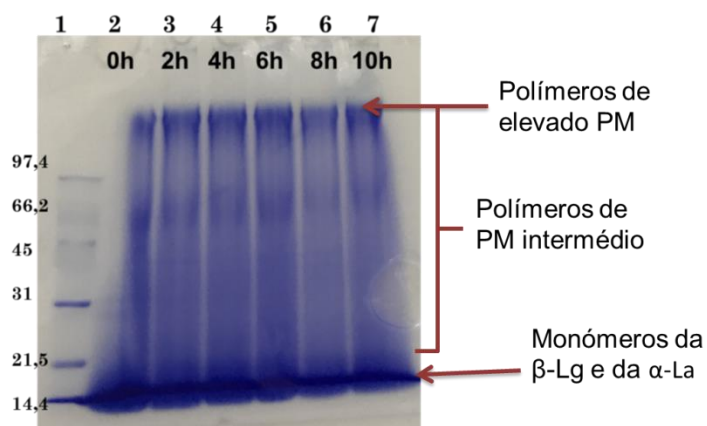


**Figura III.43:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro comercial com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com o soro comercial a 10% diluído para 30 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares *Low Range* da *Bio-Rad*. **Poço 2 a 7:** soro comercial com TG 50 U/g de proteína no soro e tempos de incubação indicados.

Com a reticulação enzimática, são formados polímeros de elevado peso molecular que, na maioria das vezes, não conseguem ser pipetados e não chegar a entrar nos poços do gel, como é o caso da figura III.43, onde a ausência das bandas no topo do gel, nem sempre são sinónimo de falta de reticulação.<sup>35,109,123</sup>

De modo a confirmar a teoria anterior, é de notar a diminuição da banda que aparece no fundo do gel, figura III.43, que corresponde aos monómeros das proteínas dominantes do soro comercial ( $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, 18,4kDa e 14kDa, respetivamente).<sup>33,35,73,109,110</sup> As proteínas, sendo reticuladas pela TG, formam agregados e polímeros de elevado peso molecular, deixando de aparecer na forma de monómeros e, conseqüentemente, diminuindo a sua banda

correspondente. Desta forma é possível provar que a reação de reticulação efetivamente ocorreu.<sup>72,105,109,110,116,123</sup>



**Figura III.44:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro comercial com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento, (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, com o soro comercial a 10% diluído para 30 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** marcador de pesos moleculares *Low Range* da *Bio-Rad*. **Poço 2 a 7:** soro comercial com TG 50 U/g de proteína no soro e tempos de incubação indicados.

Analizando agora o gel de poliacrilamida a 12%, com as mesmas amostras que o anterior mas sem a adição do  $\beta$ -Me, figura III.44, verifica-se, à semelhança do estudo cinético anterior, a existência de arrastamento das amostras. Este arrastamento é mais uma vez justificado pela ausência do agente redutor que, não tendo reagido com os agregados, co-agregados, e polímeros formados pela reticulação, não os reduziu a agregados ou monómeros com pesos moleculares equivalentes. O arrastamento da amostra é essencialmente composto por agregados e co-agregados proteicos do soro comercial com pesos moleculares intermédios.<sup>105,109,110,116</sup>

Outra prova da existência de reticulação é a diminuição da intensidade das bandas presentes no final da pista correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, 18,4kDa e 14kDa, respetivamente, figura III.44.<sup>33,35,73,109,110</sup>

A ausência de polímeros de elevado peso molecular nos poços e no topo do gel, figura III.44, à semelhança do que ocorreu no gel anterior (figura III.43), é justificada pela formação de polímeros de elevado peso molecular, durante a reação de reticulação, que não conseguem ser pipetados não chegando a ser depositados nos poços do gel.<sup>35,109,123</sup>

Devido à falta de informação relativa aos polímeros de elevado peso molecular no topo do gel é difícil averiguar, através da técnica de SDS-PAGE, neste caso de estudo, qual a melhor hora de cinética. Contudo, consegue-se provar que ocorreu a reticulação das proteínas dominantes do soro,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La.

Em suma, e através da interpretação realizada pelas duas técnicas em estudo, podemos afirmar que efetivamente houve reticulação enzimática pela TG mas não se conseguiu definir um ponto temporal específico onde esta reação atinge o máximo de reticulação. Esta, provavelmente, ocorreu logo na primeira hora de reação devido à forte afinidade da TG pelas proteínas dominantes do soro, a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La. Para além disso, e uma vez que a TG fica inativa após as 12h de reação, não faria sentido prolongar o tempo da reação.<sup>72,80,105,106</sup>



### 3. Soro de Queijo

Devido ao aumento do interesse do soro de leite pelo consumidor, e sendo o soro de queijo um dos produtos mais procurados para a posterior comercialização destes produtos, torna-se necessário responder às necessidades da população, reduzindo a alergenicidade deste produto.<sup>13,26,28</sup> Os produtos lácteos, e consequentemente o soro de queijo, são usados como base para a adição de fortificantes alimentares.<sup>2,7-9,19,20,88</sup> A inserção de iões metálicos na matriz do leite pode provocar alterações no rendimento e mecanismo da reação de reticulação das proteínas do soro pela transglutaminase.<sup>84,89,90</sup>

O soro de queijo e o soro comercial (usado no capítulo anterior) apresentam uma constituição proteica comum contudo, a sua composição apresenta algumas variações. O soro comercial estudado foi enriquecido com corantes, edulcorantes, emulsionantes e espessantes enquanto o soro de queijo não foi enriquecido com nenhum destes componentes. O soro de queijo por sua vez é constituído por água, lactose, gordura e sais minerais.<sup>4,26,28,32,102</sup>

Sendo a  $\beta$ -lactoglobulina a proteína dominante do soro de queijo, os procedimentos de pré-tratamento e análise da amostra vão ser muito semelhantes aos utilizados nos capítulos anteriores.<sup>13,14,28,118</sup> Torna-se necessário, mais uma vez, proceder-se ao aquecimento da solução de soro comercial, assim como o acerto de pH.<sup>12,38,105-108</sup> O aquecimento promove a desnaturação das proteínas, principalmente a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La, tornando possível a reticulação pela transglutaminase.<sup>16,72,105-108</sup> O acerto de pH torna-se necessário uma vez que o pH ótimo de ação da enzima, transglutaminase, é 7.<sup>18,72,105-108</sup>

No presente estudo vamos proceder à análise do soro de queijo simples (correspondente à condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH), da reticulação do mesmo, nas condições previamente otimizadas por Veloso<sup>128,129</sup>, e verificar de que forma a adição de iões metálicos, como o ião cálcio ( $\text{Ca}^+$ ), o ião zinco ( $\text{Zn}^{2+}$ ), o ião cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) e o ião ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ), podem influenciar a reação de reticulação do soro de queijo pela transglutaminase.

Realizou-se um estudo das diferentes condições de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 100 U de TG/g de proteína em solução, onde o aquecimento é realizado em banho-maria a 80°C durante 1h e o pH é acertado a 7, sendo que o pH inicial do soro comercial é inferior a 7.<sup>18,35,72,80,105-110</sup>

Com este estudo pretende-se verificar o comportamento da TG durante a reação de reticulação na presença de potenciadores, sulfato de cálcio e sulfato de zinco, e de inibidores, sulfato de cobre e sulfato de ferro, e verificar de que forma estes iões interferem no rendimento da mesma reação. Pretende-se também estudar o comportamento cinético da reação de reticulação da  $\beta$ -Lg pela TG no soro de queijo.

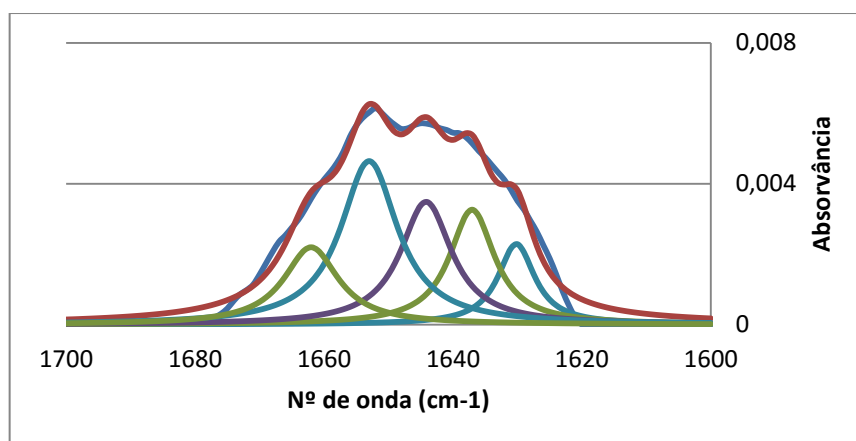
Desta forma é necessário estudar a forma como o soro de queijo se comporta sem qualquer tipo de tratamento e aditivos de forma a ser perceptível, no decorrer do estudo, perceber as alterações que são provocadas.

O presente caso de estudo foca-se no soro de queijo que foi fornecido pela *Lactovouga – lacticínios e derivados Lda®*.

### 3.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

Inicialmente, e recorrendo à espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier, FTIR, nas janelas de  $1700$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  e  $3100$  a  $2800\text{ cm}^{-1}$ , correspondente à região de amida I (figura III.45 e tabela 0.49 em anexo) e amida A e B (figura 7 e tabela 0.50 em anexo), analisou-se uma amostra de soro de queijo simples.<sup>16,39,42,72,91,93,97</sup> A região de amida I dá-nos informação sobre as estruturas secundárias das proteínas em solução, como as folhas- $\beta$  e hélices- $\alpha$ .<sup>39,72,93,97,98</sup> A região de absorção de amida A e B inclui os modos de estiramento C-H,  $\text{sp}^3$ ,  $\text{sp}^2$  e  $\text{sp}$ , dos vários grupos C-H nas cadeias laterais dos aminoácidos constituintes das proteínas ou péptidos em estudo.<sup>72,93</sup>

A desconvolução dos espectros de FTIR é essencial para se analisar as alterações provocadas, a nível estrutural, pelas condições e tratamentos a que a amostra vai sendo sujeita ao longo do estudo. A desconvolução dos espectros de FTIR é feita através da aplicação de tratamentos matemáticos, pelo programa *PeakFit v4.12*, figura III.45, onde se subtraiu a linha de base dos espectros e se procedeu à análise espectral através da soma de bandas Lorentzianas. Estas foram inseridas manualmente, e posteriormente ajustadas, com base na pesquisa realizada por Eissa et al.<sup>72</sup>.



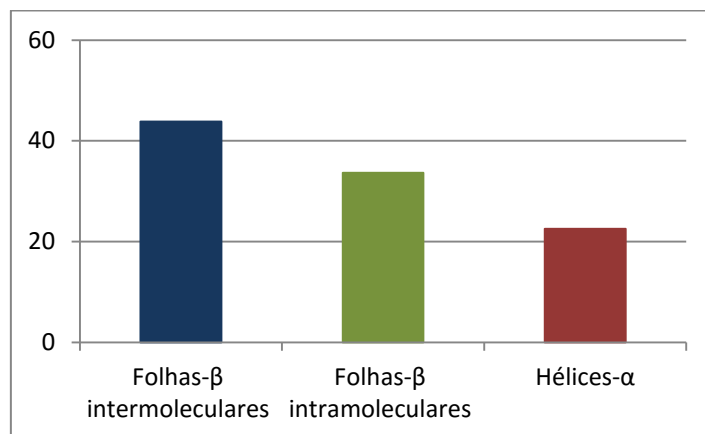
**Figura III.45:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de Amida I, janela  $1700$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$ , desconvolvido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro de queijo em  $\text{D}_2\text{O}$  na condição de pré-tratamento sem aquecimento sem acerto de pH (i). **Legenda:** a azul-escuro é o espectro observado; a vermelho é o espectro desconvolvido; a azul ciano encontram-se as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intermoleculares; a verde as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intramoleculares; a roxo a banda correspondente às hélices- $\alpha$ .

Iniciando a análise do espectro obtido, figura III.45, verifica-se que o comportamento do espectro obtido é muito semelhante aos do soro comercial (capítulo III.2) havendo um aumento no “ombro”, por volta dos  $1653\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo às folhas- $\beta$  intermoleculares.

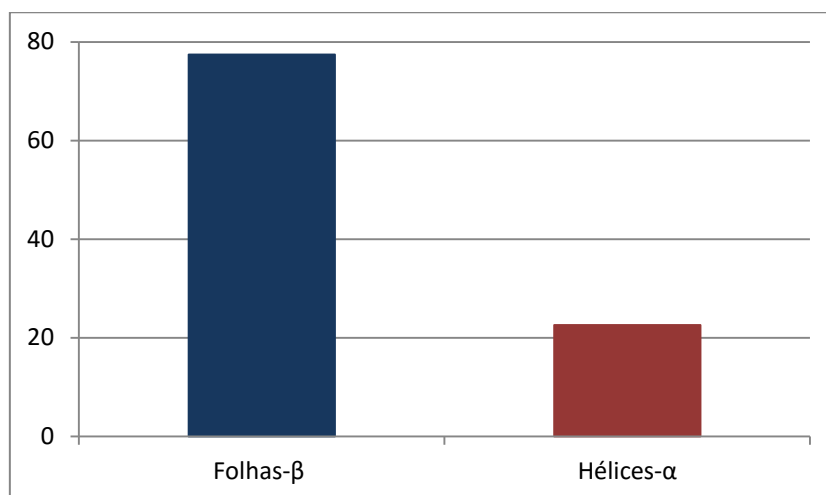


A amostra de soro simples é composta por hélices- $\alpha$ , que surgem a  $1645\text{cm}^{-1}$ , por folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1631\text{cm}^{-1}$  e a  $1653\text{cm}^{-1}$ , e por folhas- $\beta$  intramoleculares, a  $1638\text{cm}^{-1}$  e a  $1661\text{cm}^{-1}$  (figura III.45 e tabela 0.49 em anexo). Analogamente ao que ocorreu no soro comercial (capítulo III.2), não se detetaram as estruturas *random coil* no espectro após a desconvolução. Estas estruturas foram apenas detetadas no estudo da  $\beta$ -Lg pura (capítulo III.1). Ambos os soros estudados apresentam 50% de proteínas na sua constituição total.<sup>28</sup> Esta grande quantidade e variedade de proteínas vão ser detetadas na mesma região do espectro, região de amida I, dando origem a vários sinais de estruturas secundárias diferentes. Deste modo, as bandas de FTIR das estruturas predominantes, hélices- $\alpha$  e folhas- $\beta$ , vão mascarar o sinal das estruturas em *random coil* impedindo que estas sejam detetadas.<sup>28,41,59,72,91,97</sup> A atribuição das bandas às respetivas estruturas secundárias foi consoante o estudo realizado e apresentado no capítulo III.1, tabela III.1 e figura III.3.

Foi ainda obtido, através da desconvolução dos espectros, as percentagens das áreas analíticas correspondentes às diferentes estruturas secundárias em solução, figura III.46 e figura III.47 e tabela 0.49 em anexo.



**Figura III.46:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução do espectro obtido pela espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias da amostra de soro de queijo simples em  $\text{D}_2\text{O}$ , (i) sem aquecimento sem acerto de pH, na região de amida I.



**Figura III.47:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução do espectro da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias da amostra de soro de queijo simples em D<sub>2</sub>O, (i) sem aquecimento sem acerto de pH, na região de amida I.

Pela análise da figura III.46 e figura III.47, podemos constatar que as proteínas do soro de queijo são constituídas essencialmente por folhas-β, sendo que predominam as folhas-β intermoleculares sob as folhas-β intramoleculares (figura III.46). O facto de a β-Lg ser responsável por, aproximadamente, 50% da constituição proteica do soro de queijo, e de esta proteína ser essencialmente constituída por folhas-β, pode ser um dos fatores para a disparidade de valores entre as duas estruturas predominantes, folhas-β e hélices-α.<sup>10,11,28,36,39</sup>

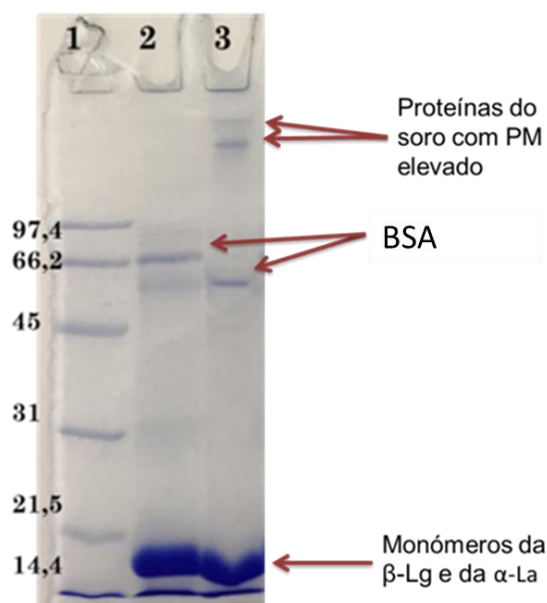
### 3.2. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

A fim de complementar análise ao soro de queijo, procedeu-se à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, SDS-PAGE, figura III.48.

As amostras foram preparadas com e sem a adição de β-mercaptoetanol (β-Me). Este agente redutor causa a redução das pontes dissulfureto que são responsáveis pela estrutura nativa da proteína, assim, ocorre a destruição das estruturas terciárias e quaternárias das proteínas.<sup>116,117</sup>

Ao apresentar estas características, o β-Me, é utilizado em análises de proteínas, como é o caso da eletroforese em géis de poliacrilamida, em que é necessário garantir a presença de moléculas proteicas monoméricas em vez de dímeros, tetrâmeros ou oligómeros de ordem superiores, que sejam ligados através de pontes dissulfureto. Para além disso, o seu grupo hidroxilo concede solubilidade em água às proteínas.<sup>116,117</sup>

Neste caso de estudo, o β-Me foi utilizado como reagente de dissociação para obter a degradação de co-agregados possivelmente formados por interações dissulfureto.<sup>116</sup>



**Figura III.48:** Gel de poliácridamida a 12%. Soro de queijo, diluído para 30mg/mL, na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. **Poço 1:** Marcador de PM Low range da BioRad; **Poço 2:** com adição de  $\beta$ -Me; **Poço 3:** sem adição de  $\beta$ -Me

Analisando o gel, figura III.48, no poço 2, com adição de  $\beta$ -Me, uma banda muito ténue correspondente ao dímero da  $\beta$ -Lg, a 36,8kDa,<sup>109</sup> uma banda por volta dos 60kDa, que pode corresponder à BSA com alguma perda da sua cadeia peptídica, assim como uma banda a 66,2kDa, que corresponde à BSA.<sup>107,130</sup> Aparece ainda uma mancha no fundo do gel que pode corresponder aos monómeros da  $\beta$ -Lg, 18,4kDa, e da  $\alpha$ -La, 14kDa.<sup>33,72,105,107–110,123</sup>

No caso do poço 3, sem adição de  $\beta$ -Me, figura III.48, verifica-se a existência de uma banda, ou mancha, no fundo do gel, com algum arrastamento, correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg (18,4kDa) e da  $\alpha$ -La (14kDa).<sup>33,72,105,107–110,123</sup> Surge também uma banda a aproximadamente 60kDa, que pode corresponder à BSA com alguma perda da sua cadeia peptídica, assim como uma banda muito ténue a 66,2kDa, que corresponde à BSA.<sup>107,130</sup>

Surgem ainda umas bandas no início do gel, que podem corresponder às imunoglobulinas, a aproximadamente 144kDa, assim como aos dímeros da lactoferrina e lactoperoxidase, que aparecem a aproximadamente 160kDa e 155kDa, respetivamente.<sup>4,45,126,127</sup> Estas bandas não aparecem no poço 2, possivelmente devido à ação do agente redutor,  $\beta$ -Me, que ao degradar os agregados, co-agregados ou aglomerados proteicos fez com que estas bandas aparecessem, muito discretamente, por volta dos 66kDa.<sup>116,117</sup>

### 3.3. Análise do efeito das frações azotadas na proteólise

A proteólise é um fenómeno bioquímico que afeta o desempenho funcional das proteínas. Uma vez que o soro de queijo é altamente rico em proteínas é importante conseguir monitorizar o grau de proteólise ao longo dos tratamentos aplicados durante o presente

estudo.<sup>21,103,125</sup> As enzimas são os principais agentes proteolíticos que podem ter origem no próprio leite<sup>21,103</sup>

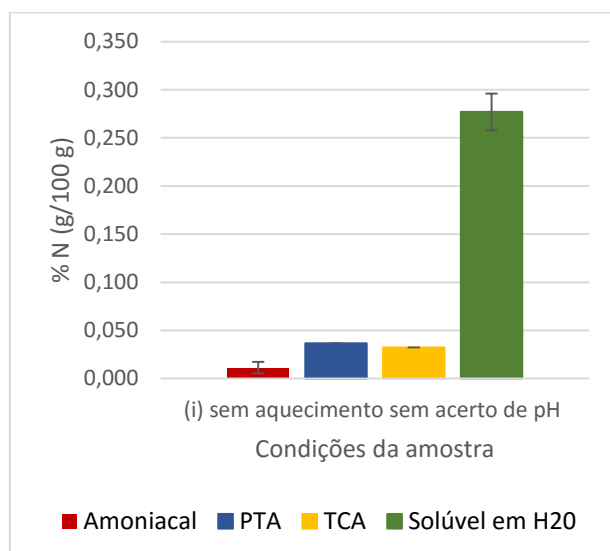
A determinação do azoto total, tabela III.4, foi feita recorrendo ao método de Kjeldahl onde se admitiu que todo o azoto em solução se encontra na forma proteica. O valor obtido foi convertido em proteína bruta através da aplicação do fator de conversão 6.38, conforme disposto na IDF 25:2008.<sup>21,103</sup>

**Tabela III.4:**Valores médios e desvio padrão correspondentes ao azoto total e quantidade de proteína em solução do soro de queijo.

	Azoto Total (g/100g)	Média Azoto Total (g/100g)	Desvio padrão	Proteína (g/100g)	Média da proteína (g/100g)	Desvio padrão
Soro de queijo amostra (1)	0,29	0,28	0,01	1,80	1,72	0,07
Soro de queijo amostra (2)	0,26			1,65		

A quantidade de proteína na amostra, 1,72g de proteína por 100g de soro de queijo, foi determinada na amostra de soro de queijo fornecida pelo fabricante, sem qualquer tipo de tratamento. (tabela III.4)

De seguida, procedeu-se ao cálculo das frações de azoto correspondentes ao azoto solúvel em água (WSN), azoto solúvel em TCA 12%, ou azoto não proteico (TCASN), azoto solúvel em PTA 5%, ou azoto aminoacídico (PTASN), e azoto amoniacal (NH<sub>3</sub>), conforme indicado na figura III.49.



**Figura III.49:** Valores médios e desvio padrão correspondentes para o azoto amoniacal, azoto solúvel em PTA 5%, azoto solúvel em TCA 12% e azoto solúvel em água, obtidos na amostra de soro de queijo simples em estudo.

Conforme o espectável, o azoto solúvel em água (WSN), que deteta todas as formas de azoto solúveis em água, apresenta valores muito superiores, quando comparado com as restantes análises. Esta grande diferença, relativamente ao azoto solúvel em TCA 12% (TCASN) indica a presença de uma quantidade elevada de pequenas proteínas e péptidos médios.<sup>21,101,103</sup>

Os valores de azoto solúvel em TCA 12% e de azoto solúvel em PTA 5% (PTASN) são praticamente iguais, mostrando a inexistência de péptidos de pequena dimensão e de uma quantidade reduzida de aminoácidos livres.<sup>21,101,103</sup>

Por último, verifica-se que o azoto amoniacal ( $\text{NH}_3$ ), que só identifica o azoto na forma de  $\text{NH}_3$ , é o que apresenta os valores de azoto mais baixos.<sup>21,101,103</sup>

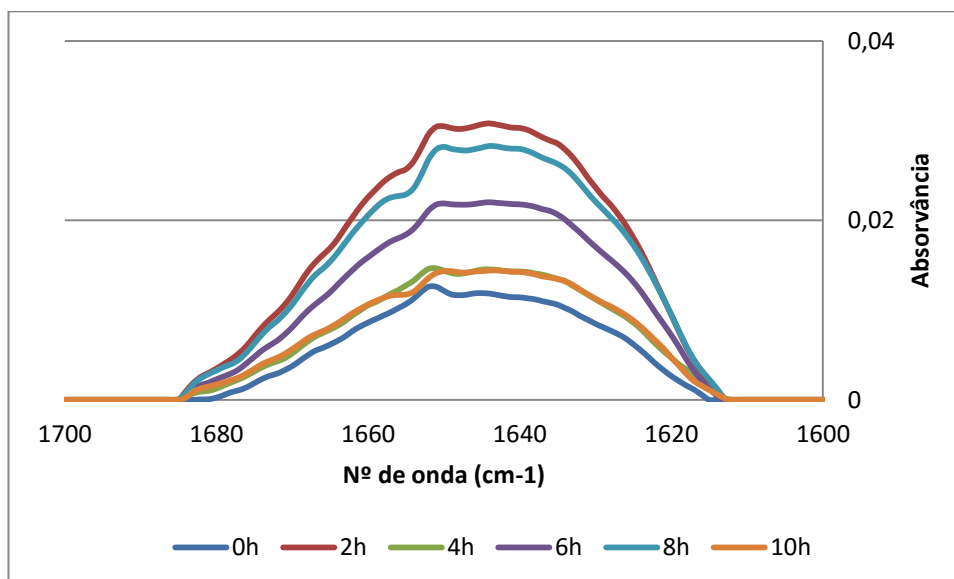
#### 3.4. Análise do soro de queijo em condições otimizadas: com aquecimento seguido do acerto de pH com 100U de transglutaminase/g de proteína, 10h

De acordo com os estudos realizados por Veloso<sup>128,129</sup>, a condição de pré-tratamento ótima consiste no pré-aquecimento da amostra a 80°C durante 1h, seguida do acerto do pH, a pH=7, condição de pré-tratamento (iv). No caso da reticulação enzimática das proteínas do soro de queijo pela TG, deve ser feita na presença de 100U de TG/g de proteína, durante 10h numa estufa a 50°C.

##### 3.4.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

Inicialmente, recorreu-se à espectroscopia de FTIR, na região de amida I, para fazer uma primeira análise ao estudo da cinética do soro de queijo com 100U de TG/g de proteína em solução, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Assim obtiveram-se os espectros, relativos aos diferentes pontos temporais do estudo cinético, apresentados na figura III.50. (tabela 0.51 em anexo)



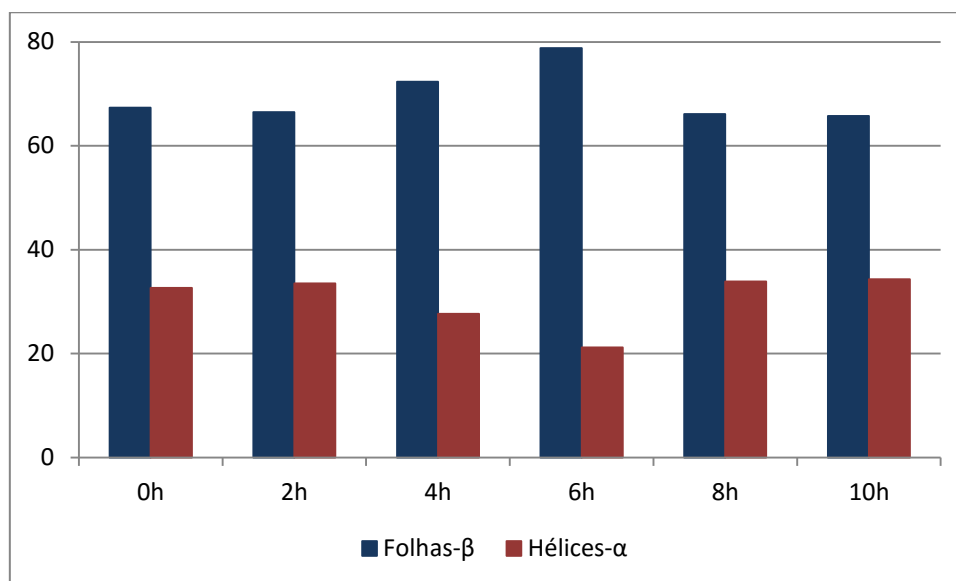
**Figura III.50:** Espectros, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, do estudo cinético da reticulação de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Fazendo uma análise inicial ao aspeto geral dos espectros, figura III.50, verificamos que todos apresentam o mesmo comportamento, sendo muito semelhantes entre si. Contudo, e a partir da hora seis, há o aparecimento de um pequeno ombro por volta dos  $1660\text{cm}^{-1}$ . Este ombro surge na gama das folhas- $\beta$  sendo um indicativo de reticulação.<sup>72</sup>

Não existe nenhum tipo de linearidade quanto ao aumento de horas de cinética e a intensidade, não podendo ser retiradas quaisquer tipo de conclusões, figura III.50. É de salientar que o espectro correspondente ao início da reação de reticulação, hora zero, é o que apresenta valores de intensidade mais baixos, e que o espectro que apresenta valores de intensidade mais elevados corresponde à amostra retirada com duas horas de reação, figura III.50. Verifica-se também que os espectros correspondentes à hora quatro e dez se encontram sobrepostos, figura III.50.

Realizou-se ainda a desconvolução dos espectros obtidos através da espectroscopia de FTIR, através da aplicação de tratamentos matemáticos, recorrendo ao programa *PeakFit* v4.12. (figura III.51 e tabela 0.51 em anexo) Desta forma, foi possível obter as bandas, e respetivas áreas relativas em percentagem, correspondentes às diferentes estruturas secundárias dos polímeros das proteínas presentes na solução de soro de queijo reticulada com TG. Sendo elas as folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares e as hélices- $\alpha$ . (figura III.51 e tabela 0.51 em anexo)

De forma a obter-se uma análise mais concisa e direta, calculou-se o somatório das áreas analíticas relativas de todas as folhas- $\beta$  em solução e das hélices- $\alpha$ , figura III.51 e tabela 0.51 em anexo.



**Figura III.51:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH, na região de amida I.

Comparando os valores dos somatórios das áreas analíticas das folhas- $\beta$  com as áreas analíticas das hélices- $\alpha$ , figura III.51, verifica-se que estas últimas são sempre bastantes inferiores, sendo um sinal de reticulação.<sup>39,72,95,97</sup>

A reticulação das proteínas do soro de queijo na presença de TG permite a observação de ligeiras diferenças, na região de amida I, quando comparadas com as alterações provocadas pela desnaturação térmica.<sup>72</sup> Na reação de reticulação, o microambiente em torno do grupo carbonilo da cadeia lateral da glutamina que vai reagir com a lisina é alterado, dando origem a alterações na região de amida I. Contudo, o número de novas ligações formadas, que interferem na cadeia central das proteínas, é baixo levando a poucas alterações no espectro.<sup>72</sup>

A TG, ao favorecendo a formação das ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina, dá origem a novas ligações intermoleculares, quando a reação ocorre entre duas moléculas diferentes.<sup>105</sup> Assim ocorre a formação de novas ligações de pontes de hidrogénio, que podem ser intermoleculares ou intramoleculares. Desta forma há uma reorganização das estruturas secundárias das proteínas provocando um aumento tanto da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares como das folhas- $\beta$  intramoleculares.<sup>72,106,107</sup>

Analisando o aspeto geral consoante as horas da reação de reticulação, figura III.51, verifica-se que vai havendo um aumento das folhas- $\beta$  até à hora seis, indicando um aumento da reticulação pela TG das proteínas do soro de queijo ao longo do tempo.<sup>39,40,72,91,97</sup> A partir da hora seis, figura III.51, há uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  em solução, indicando que a reação de reticulação atingiu o seu patamar de saturação.<sup>72,105–107</sup> (tabela 0.51 em anexo)

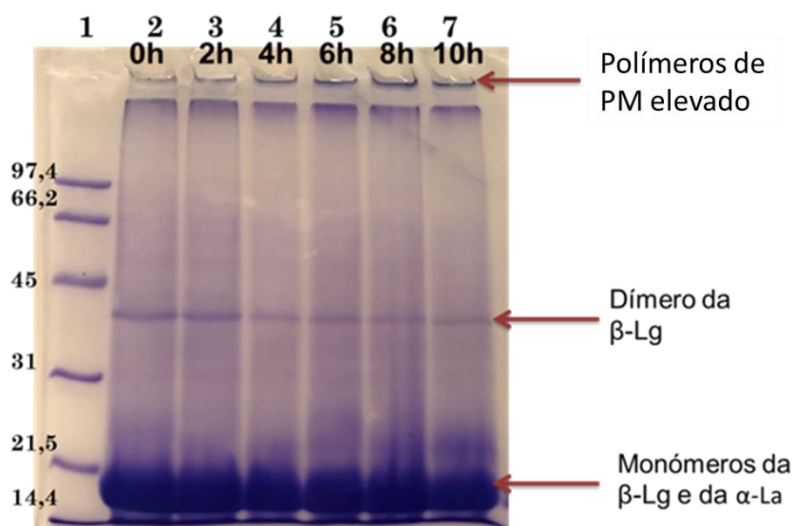
Podemos concluir, que o melhor tempo de reação é até às 6h uma vez que é onde se regista o máximo de folhas- $\beta$  e um mínimo de hélices- $\alpha$  em solução de soro de queijo (figura

III.51 e tabela 0.51 em anexo) e consequentemente onde se regista maior reticulação das proteínas do soro de queijo em solução.<sup>39,40,72,91,97</sup>

### 3.4.2. Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

De forma a complementar e confirmar os resultados obtidos pela espectroscopia de FTIR, recorreu-se à análise das mesmas amostras pela eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Para tal correram-se as amostras referentes às diferentes horas de cinética na presença e na ausência do agente redutor,  $\beta$ -Me, figura III.52 e figura III.53, respetivamente.

#### 3.4.2.1. Com adição de $\beta$ -Mercaptoetanol



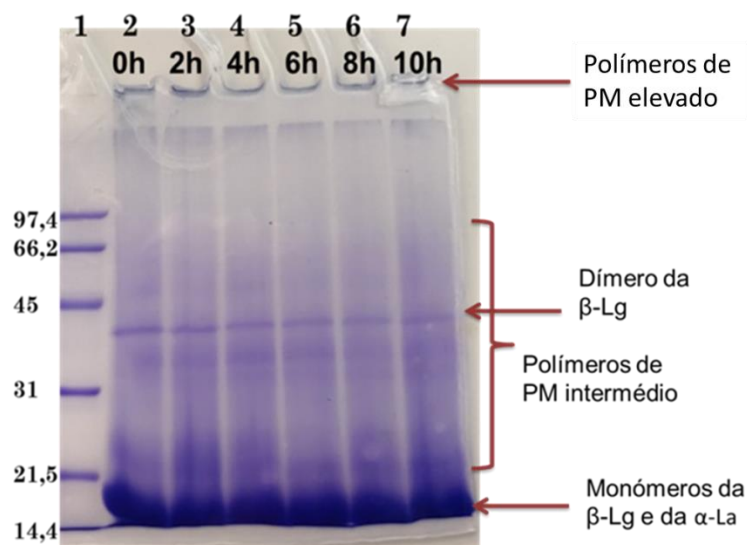
**Figura III.52:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro de queijo com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, com o soro de queijo a 10% diluído para 30 mg/mL com adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1** Marcador de PM *Low range* da *BioRad*; **Poço 2 a 7:** soro de queijo com TG 100U/g de proteína no soro e tempos de incubação indicados.

Analisando o gel de SDS-PAGE onde as amostras correram sem adição do agente redutor,  $\beta$ -Me, figura III.52. A existência de polímeros de elevado peso molecular no topo do gel assim como a existência de retenção de amostra nos poços, figura III.52, é justificada pela formação de polímeros de elevado peso molecular, durante a reação de reticulação, que não conseguem entrar na rede do gel e ficam retidos nos poços.<sup>35,105,108–110,116,123</sup>

É de notar uma ligeira diminuição da banda que aparece no fundo do gel, figura III.52, que corresponde aos monómeros das proteínas dominantes do soro comercial ( $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, 18,4kDa e 14kDa, respetivamente) e da banda que aparece por volta dos 36kDa que corresponde ao dímero da  $\beta$ -Lg.<sup>33,35,73,109,110</sup> As proteínas, sendo reticuladas pela TG, formam agregados e polímeros de elevado peso molecular, deixando de aparecer na forma de monómeros ou dímeros e, consequentemente, diminuindo a sua banda correspondente. Desta forma é possível provar que a reação de reticulação efetivamente ocorreu.<sup>72,105,109,110,116,123</sup>



### 3.4.2.2. Sem adição de $\beta$ -Mercaptoetanol



**Figura III.53:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à cinética da reação de reticulação do soro de queijo com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, com o soro de queijo diluído para 30 mg/mL sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** Marcador de PM *Low range* da *BioRad*; **Poço 2 a 7:** soro de queijo com TG 100U/g de proteína no soro e tempos de incubação indicados.

Analizando agora o gel de poliacrilamida a 12%, com as mesmas amostras que o anterior mas sem a adição do  $\beta$ -Me, figura III.53, verifica-se a existência de arrastamento das amostras. Este arrastamento é justificado pela ausência do agente redutor que, não tendo reagido com os agregados, co-agregados, e polímeros formados pela reticulação, não os reduziu a agregados ou monómeros com pesos moleculares equivalentes. O arrastamento da amostra é essencialmente composto por polímeros, das proteínas do soro comercial que reagiram com a TG, com pesos moleculares intermédios.<sup>105,109,110,116</sup>

A diminuição da banda no fundo do poço correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, 18,4kDa e 14kDa, respetivamente, assim como a diminuição da banda correspondente ao dímero da  $\beta$ -Lg, a 36kDa, figura III.53, vem provar a existência de reticulação.<sup>33,35,73,109,110</sup>

Com a reticulação enzimática, são formados polímeros de elevado peso molecular que, na maioria das vezes, não conseguem ser pipetados e não chegar a entrar nos poços do gel, como é o caso da figura III.53, onde a ausência das bandas no topo do gel, nem sempre são sinónimo de falta de reticulação.<sup>35,109,123</sup>

Devido à falta de informação relativa aos polímeros de elevado peso molecular no topo do gel e ao facto de não haver uma diminuição da intensidade da mancha correspondente aos monómeros das proteínas,  $\beta$ -Lg e  $\alpha$ -La, é difícil averiguar, através da técnica de SDS-PAGE, qual a melhor hora de cinética. Contudo, consegue-se provar que ocorreu a reticulação da  $\beta$ -Lg, pela diminuição da banda correspondente ao seu dímero.<sup>33,35,73,109,110</sup>

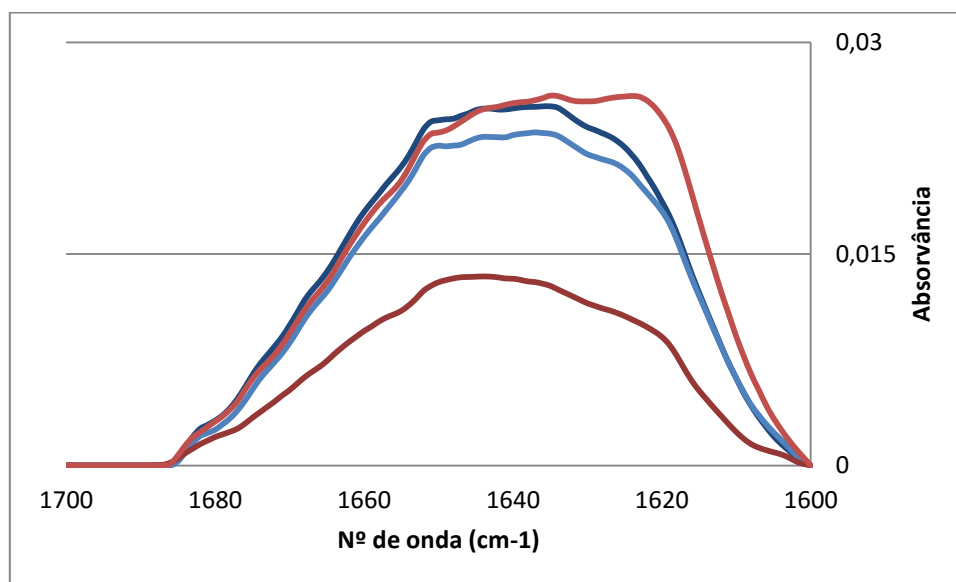
### 3.5. Estudo da adição de potenciadores e inibidores de transglutaminase na melhor condição de pré-tratamento de soro de queijo

Uma vez que o interesse do consumidor em alimentos fortificados tem aumentado, nomeadamente em produtos lácteos. Realizou-se um estudo que se baseia na introdução de quatro iões que têm sido utilizados como fortificantes, nomeadamente do leite.<sup>7-9,19,20,87</sup>

Sabe-se que, segundo Ando<sup>89</sup> existem metais que potenciam e inibem a ação da TG. Seleccionaram-se dois potenciadores, cálcio e zinco, e dois inibidores, cobre e ferro, e, estudou-se o seu efeito nas condições de reticulação da TG no soro de queijo optimizadas, condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de proteína durante 6h numa estufa a 50°C.<sup>89</sup>

#### 3.5.1. Análise segundo a espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier

Procedeu-se à análise do soro de queijo reticulado na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH na presença de 100U de TG/g de proteína durante 10h, recorrendo à espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier, FTIR, nas janelas de 1700 a 1600  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à região de amida I (figura III.54 e tabelas 0.52 e 0.53 em anexo).<sup>16,39,42,72,91,93,97</sup> A região de amida I dá-nos informação sobre as estruturas secundárias da proteína, como as folhas- $\beta$ , hélices- $\alpha$ .<sup>39,72,93,97,98</sup>



**Figura III.54:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvolvido, através do programa *PeakFit v4.12*, relativos ao estudo da amostra de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH com a adição de potenciadores e inibidores. **Legenda:** a azul-escuro é o espectro correspondente ao sulfato de cálcio; a azul-claro é o espectro correspondente ao sulfato de zinco; a vermelho-escuro é o espectro correspondente ao sulfato de cobre; a vermelho-claro é o espectro correspondente ao sulfato de ferro.

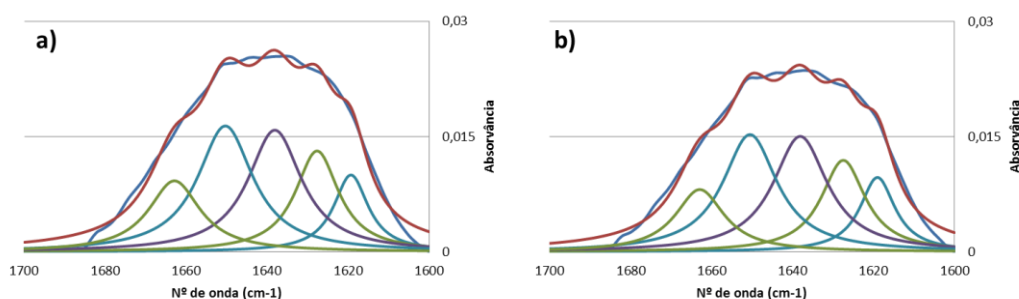
Iniciando a análise pelo aspeto geral dos espectros, figura III.54, verifica-se uma diferença nos comportamentos dos espectros correspondentes aos inibidores, sulfato de cobre (a vermelho-escuro) e sulfato de ferro (a vermelho-claro), quando comparados com os espectros dos potenciadores, sulfato de cálcio (a azul-escuro) e sulfato de zinco (a azul-claro).

Os espectros correspondentes aos inibidores, figura III.54, apresentam um ombro a aproximadamente a  $1620\text{cm}^{-1}$ , na gama das folhas- $\beta$ , o que não acontece nos espectros correspondentes aos potenciadores. O espectro correspondente ao sulfato de ferro (a vermelho-claro na figura III.54) é o que apresenta uma intensidade mais elevada, e apresenta um deslocamento do espectro para a direita, ocorrendo um aumento dos valores de energia. O espectro que apresenta uma intensidade mais baixa corresponde ao espectro do sulfato de cobre (a vermelho-escuro, figura III.54).

### 3.5.1.1. Potenciadores da Transglutaminase

Os iões de cálcio e de zinco, correspondentes aos potenciadores da transglutaminase, foram introduzidos nas amostras de soro de queijo sob a forma de sulfato de cálcio e sulfato de zinco.<sup>89</sup>

A desconvolução dos espectros de FTIR é essencial para se analisar as alterações provocadas pela adição de potenciadores de TG à reação de reticulação das proteínas do soro nas condições otimizadas por Veloso<sup>128,129</sup>. A desconvolução dos espectros de FTIR é feita através da aplicação de tratamentos matemáticos, pelo programa *PeakFit v4.12*, figura III.55, onde se subtraiu a linha de base dos espectros e se procedeu à análise espectral através da soma de bandas Lorentzianas. Estas foram inseridas manualmente, e posteriormente ajustadas, com base na pesquisa realizada por Eissa.<sup>72</sup>



**Figura III.55:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH. **a)** com adição de sulfato de cálcio. **b)** com adição de sulfato de zinco. **Legenda:** a azul-escuro é o espectro observado; a vermelho é o espectro desconvoluido; a azul ciano encontram-se as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intermoleculares; a verde as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intramoleculares; a roxo a banda correspondente às hélices- $\alpha$ .

Comparando o soro de queijo simples, na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH, com o soro de queijo na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguida do acerto de pH na presença de 100 U de TG/g de proteína fortificado com sulfato de cálcio, verifica-se, que com a adição do fortificante, há uma diminuição da influência de folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1650\text{cm}^{-1}$ , e das hélices- $\alpha$ , a  $1640\text{cm}^{-1}$ . Quanto às

restantes estruturas secundárias, folhas- $\beta$  intermoleculares (a  $1622\text{cm}^{-1}$ ), folhas- $\beta$  intramoleculares (a  $1630\text{cm}^{-1}$  e a  $1664\text{cm}^{-1}$ ), não se registaram alterações significativas. (figura III.55 e tabela 0.52 em anexo)

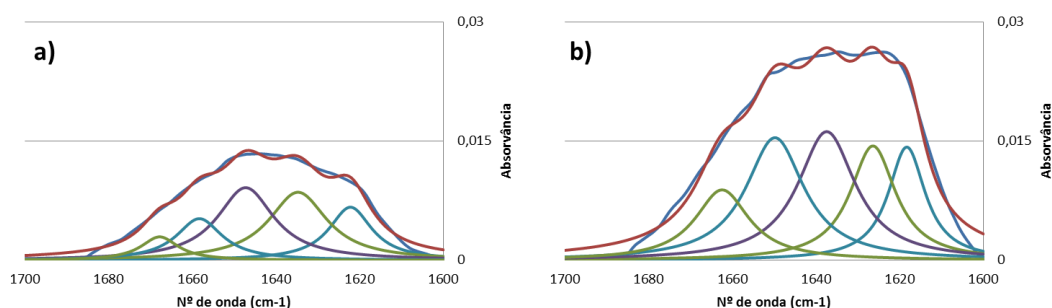
Comparando agora o soro de queijo, em condições otimizadas, com adição de sulfato de zinco, verifica-se um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1622\text{cm}^{-1}$ , e das hélices- $\alpha$ , a  $1639\text{cm}^{-1}$ . Regista-se também uma diminuição das folhas- $\beta$  intramoleculares, a  $1630\text{cm}^{-1}$  e a  $1662\text{cm}^{-1}$ , e das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1650\text{cm}^{-1}$ . (figura III.55 e tabela 0.52 em anexo)

Comparando agora as diferenças entre o soro de queijo, em condições otimizadas, fortificado com sulfato de cálcio e com sulfato de zinco não se registam alterações significativas quanto à influência das estruturas secundárias. (figura III.55 e tabela 0.52 em anexo)

### 3.5.1.2. Inibidores da Transglutaminase

Os iões de cobre e ferro, correspondentes aos inibidores da transglutaminase, foram introduzidos nas amostras de soro de queijo sob a forma de sulfato de cobre e sulfato de ferro.<sup>89</sup>

De forma a ser possível analisar as alterações provocadas pela adição de inibidores à reação de reticulação, procedeu-se à desconvolução dos espectros de através da aplicação de tratamentos matemáticos, pelo programa *PeakFit v4.12*, figura III.56, onde se subtraiu a linha de base dos espectros e se procedeu à análise espectral através da soma de bandas Lorentzianas. Estas foram inseridas manualmente, e posteriormente ajustadas, com base na pesquisa realizada por Eissa.<sup>72</sup>



**Figura III.56:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida I, desconvoluído, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH. **a)** com adição de sulfato de cobre. **b)** com adição de sulfato de ferro. **Legenda:** a azul-escuro é o espectro observado; a vermelho é o espectro desconvoluído; a azul ciano encontram-se as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intermoleculares; a verde as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intramoleculares; a roxo a banda correspondente às hélices- $\alpha$ .

Comparando agora o soro de queijo simples, na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH, com o soro de queijo, em condições otimizadas, fortificado com sulfato de cobre, verifica-se, que com a adição do fortificante, há um aumento da influência de folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, a  $1625\text{cm}^{-1}$  e a  $1637\text{cm}^{-1}$ ,

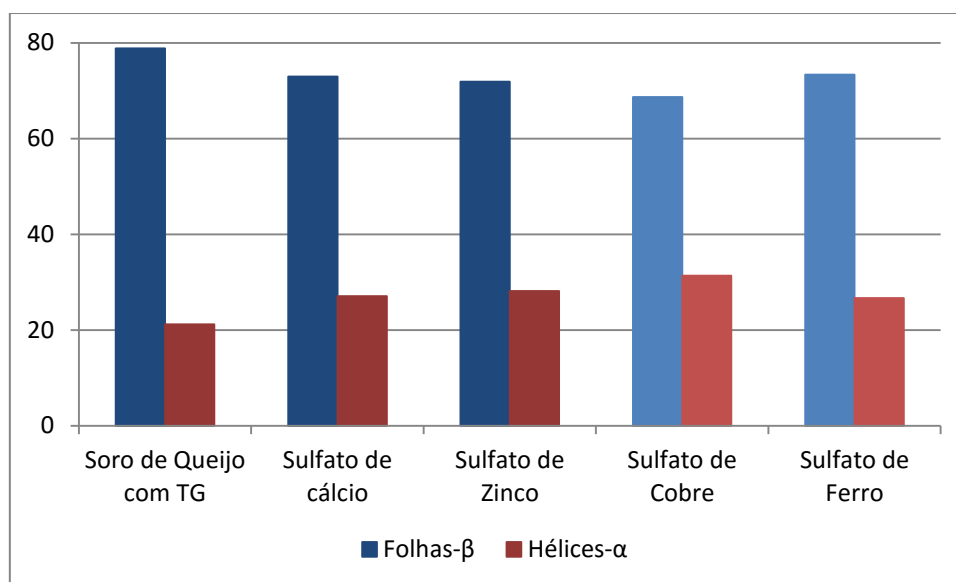
respetivamente, e das hélices- $\alpha$ , a  $1648\text{cm}^{-1}$ . Regista-se ainda uma diminuição da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, a  $1658\text{cm}^{-1}$  e a  $1666\text{cm}^{-1}$ , respetivamente. (figura III.56 e tabela 0.53 em anexo)

Comparando o soro de queijo, em condições otimizadas, com adição de sulfato de ferro, verifica-se um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1621\text{cm}^{-1}$ , das hélices- $\alpha$ , a  $1639\text{cm}^{-1}$ , e das folhas- $\beta$  intramoleculares, a  $1661\text{cm}^{-1}$ . Regista-se também uma diminuição das folhas- $\beta$  intermoleculares, a  $1656\text{cm}^{-1}$ , e não se registaram alterações significativas quanto às folhas- $\beta$  intramoleculares, a  $1629\text{cm}^{-1}$ . (figura III.56 e tabela 0.53 em anexo)

Por último, comparando as diferenças entre o soro de queijo, em condições otimizadas, fortificado com sulfato de cobre e com sulfato de ferro, no caso em que se adiciona sulfato de ferro, há uma diminuição da influência de folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, a  $1621\text{cm}^{-1}$  e a  $1629\text{cm}^{-1}$ , respetivamente, e das hélices- $\alpha$ , a  $1639\text{cm}^{-1}$ . Regista-se ainda um aumento da influência das folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, a  $1656\text{cm}^{-1}$  e a  $1661\text{cm}^{-1}$ , respetivamente. (figura III.56 e tabela 0.53 em anexo)

### 3.5.1.3. Comparação entre o soro de queijo fortificado com potenciadores ou com inibidores da Transglutaminase

De forma a complementar a informação obtida até agora, calcularam-se os somatórios das áreas analíticas relativas das folhas- $\beta$  intermoleculares e das hélices- $\alpha$ , figura III.57 e tabelas 0.52 e 0.53 em anexo.



**Figura III.57:** Percentagem das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução dos espectros da espectroscopia de FTIR, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH relativas ao estudo da adição de inibidores (tonalidade clara) e potenciadores (tonalidade escura) da TG, na região de amida I.

Segundo os estudos realizados por Eissa<sup>72</sup> quando ocorre reticulação das proteínas do soro de leite, com maior incidência na  $\beta$ -Lg, há um aumento de influência das folhas- $\beta$  em

solução. Isto acontece devido ao rearranjo estrutural durante a reação de reticulação, conduzindo à formação de polímeros de elevado PM.<sup>39,72,95,97</sup> É natural que no soro de queijo ocorra um fenómeno semelhante já que são poucas as suas diferenças em termos de composição proteica.<sup>4,26,28,32,102</sup>

Seria de esperar um aumento da percentagem de folhas- $\beta$  quando se adicionam à reação os potenciadores de TG, e no caso em que se adicionam os inibidores, seria de esperar uma redução dos mesmos valores de conteúdo em folhas- $\beta$ . Contudo, não são visíveis alterações significativas, figura III.57, quando se adicionam os sulfatos metálicos em estudo, nomeadamente sulfato de cálcio e sulfato de zinco (potenciadores) e sulfato de cobre e sulfato de ferro (inibidores).<sup>39,40,42,59,72,91,95,97</sup> (tabelas 0.52 e 0.53 em anexo)

As amostras de soro de queijo em condições otimizadas de pré-tratamento e reticulação com a adição dos inibidores, sulfato de cobre e sulfato de ferro, apresentam valores inferiores, relativos ao somatório das áreas analíticas das folhas- $\beta$ , figura III.57, quando comparados com a amostra de soro de queijo reticulada nas mesmas condições sem aditivos. Verifica-se uma redução de 13% no caso em que se adicionou sulfato de cobre e uma redução de 7% na amostra em que se adicionou sulfato de ferro. Estes resultados comprovam que, quando a TG está sob a presença destes aditivos alimentares com objetivos fortificantes, o rendimento da reação de reticulação das proteínas do soro pela TG é inferior, provando assim que os iões de ferro e de cobre inibem a ação da TG.<sup>39,40,42,59,72,91,95,97</sup> (tabelas 0.52 e 0.53 em anexo)

No caso em que se adicionam os potenciadores, sulfato de cálcio e sulfato de zinco, comparando com a amostra de soro de queijo nas mesmas condições de reação, regista-se, em ambos os casos, uma redução dos valores de folhas- $\beta$ , 7,3% e 8,8%, respetivamente (figura III.57). Estes resultados vêm contradizer os resultados obtidos por Macedo<sup>90</sup>, e nos quais nos baseamos neste estudo, que afirmam que ambos os iões, de cálcio e de zinco, são potenciadores da atividade da TG. Por outro lado os estudos realizados por Ando<sup>89</sup> afirmam que os iões de cálcio não provocam alterações na atividade da TG e que os iões de ferro a inibem, provocando uma redução de cerca de 11%. No nosso estudo verificamos que os iões de ferro inibem a ação da TG confirmando os resultados obtidos por Ando<sup>89</sup> e que os iões de cálcio também inibem a atividade da TG, contrariando os resultados obtidos pelos dois autores.<sup>39,40,42,59,72,89-91,95,97</sup> (tabelas 0.52 e 0.53 em anexo)

Em suma, a atividade da TG é inibida pelos quatro iões em estudo,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , contrariamente ao obtido na literatura para os dois primeiros iões.<sup>89,90</sup> De forma a confirmar ou suplementar os resultados obtidos, deveria realizar-se outro estudo com diferentes quantidades dos iões e verificar de que forma a concentração dos iões em solução influencia a ação da TG.

### 3.5.2. Análise segundo a eletroforese em gel de poliacrilamida: SDS-PAGE

Realizou-se também uma análise das amostras de soro de queijo, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 100 U de TG/g de proteína, fortificado com potenciadores da transglutaminase, sulfato de cálcio e sulfato de

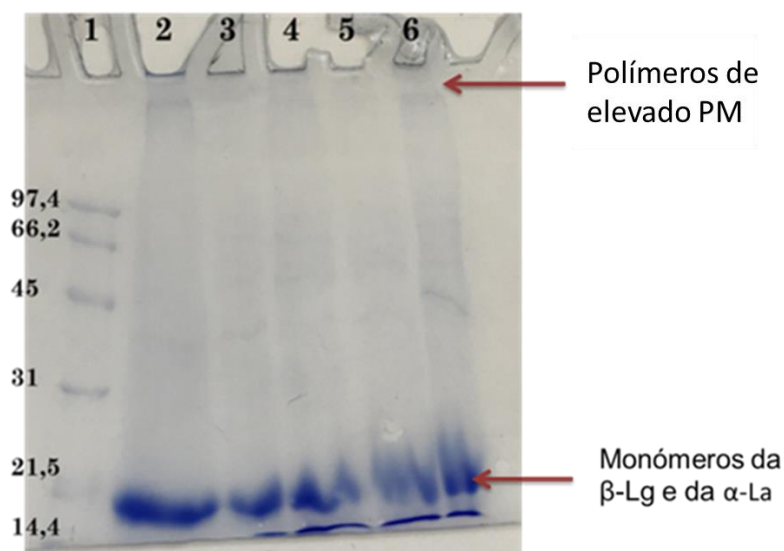
zinco, ou com inibidores, sulfato de cobre e sulfato de ferro, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, SDS-PAGE, figura III.58 e figura III.59.

As amostras foram preparadas com e sem a adição de  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -Me).

O  $\beta$ -Me, é utilizado em análises de proteínas, como é o caso da eletroforese em géis de poliacrilamida, em que é necessário garantir a presença de moléculas proteicas monoméricas em vez de dímeros, tetrâmeros ou oligómeros de ordem superiores, que sejam ligados através de pontes dissulfureto. Para além disso, o seu grupo hidroxilo concede solubilidade em água às proteínas.<sup>116,117</sup>

Neste caso de estudo, o  $\beta$ -Me foi utilizado como reagente de dissociação para obter a degradação de co-agregados possivelmente formados por interações dissulfureto.<sup>116</sup>

### 3.5.2.1. Com adição de $\beta$ -Mercaptoetanol



**Figura III.58:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à adição de potenciadores e inibidores da TG ao soro de leite com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, com o soro de queijo a 10% diluído para 30 mg/mL, com adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** Marcador de PM *Low range* da *BioRad*; **Poço 2:** Soro de queijo simples, (i) sem aquecimento sem acerto de pH; **Poço 3:** Com adição de sulfato de cálcio,  $\text{CaSO}_4$ ; **Poço 4:** com adição de sulfato de zinco,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; **Poço 5:** com adição de sulfato de cobre,  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; **Poço 6:** com adição de sulfato de ferro,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

Analisando o gel de poliacrilamida em que as amostras foram sujeitas à ação do agente redutor,  $\beta$ -Me, vê-se uma mancha no fundo do gel, figura III.58 poços 2 a 6, correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, 18kDa e 14kD, respetivamente.<sup>33,35,73,109,110</sup>

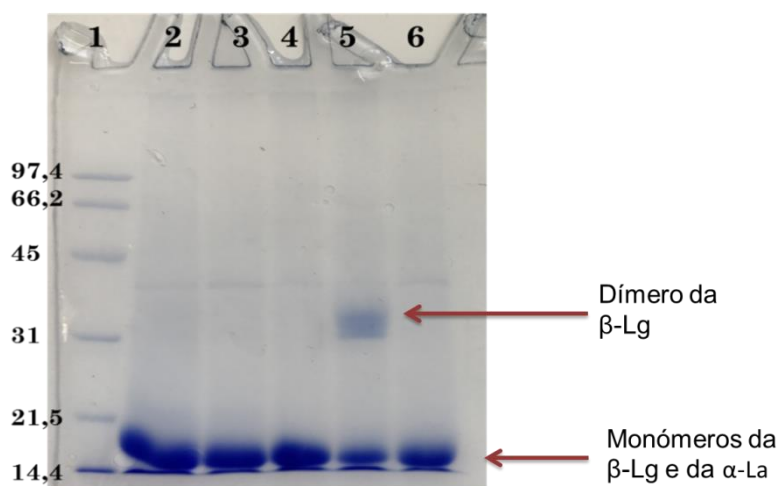
Podemos afirmar que houve reticulação enzimática uma vez que a mancha correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, 18kDa e 14kD, respetivamente, da amostra de soro simples, figura III.58 poço 2, é maior do que nas amostras de soro de queijo fortificado, figura III.58 poços 3 a 6.<sup>72,105,109,110,116,123</sup>

Nos poços onde se adicionaram os inibidores da TG, sulfato de cobre e sulfato de ferro, figura III.58 poços 5 e 6, respetivamente, verifica-se que a mancha correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La (18kDa e 14kDa) é menor que a mancha, das mesmas



proteínas, no caso onde se adicionaram às amostras os potenciadores da TG, sulfato de cálcio e sulfato de zinco, figura III.58 poços 3 e 4, respetivamente.<sup>33,35,73,109,110</sup> A diminuição da banda correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La prova que existiu reticulação enzimática, e em teoria a banda correspondente aos inibidores, figura III.58 poços 5 e 6, deveria ser maior do que a banda correspondente aos potenciadores, figura III.58 poços 3 e 4, uma vez que ao haver mais reticulação enzimática há uma diminuição dos monómeros das proteínas em solução devido à formação de polímeros.<sup>72,105,109,110,116,123</sup> Apesar dos polímeros não serem muito visíveis no gel, figura III.58, sabe-se que a TG ao reagir com as proteínas do soro forma polímeros de pesos moleculares elevados que, na maioria das vezes, não conseguem entrar na rede do gel ficando retidos nos poços, ou não chegam a ser pipetados, não conseguindo entrar na ponta da pipeta, sendo muitas vezes visível a olho nu o aglomerado formado.<sup>35,109,123</sup>

### 3.5.2.2. Sem adição de $\beta$ -Mercaptoetanol



**Figura III.59:** Gel de poliacrilamida a 12% relativo à adição de potenciadores e inibidores da TG ao soro de leite com 100U de TG/g de proteína, na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH, com o soro de queijo a 10% diluído para 30 mg/mL, sem adição de  $\beta$ -Me. **Poço 1:** Marcador de PM *Low range* da *BioRad*; **Poço 2:** Soro de queijo simples, (i) sem aquecimento sem acerto de pH; **Poço 3:** com adição se sulfato de cálcio; **Poço 4:** com adição se sulfato de zinco; **Poço 5:** com adição se sulfato de cobre; **Poço 6:** com adição se sulfato de ferro.

No caso em que não se procedeu à adição de  $\beta$ -Me às amostras de soro de queijo em estudo, figura III.59 poços 2, verifica-se em todos os poços a existência da banda, figura III.59 poços 3 a 6, correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, 18kDa e 14kD, respetivamente.<sup>33,35,73,109,110</sup>

Mais uma vez, e corroborando os resultados obtidos na análise da figura III.58, podemos afirmar que houve reticulação enzimática uma vez que a mancha correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, 18kDa e 14kD, respetivamente, da amostra de soro simples, figura III.59 poço 2, é maior do que nas amostras de soro de queijo fortificado, figura III.59 poços 3 a 6.<sup>72,105,109,110,116,123</sup>

Verifica-se que a banda correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, no fundo do gel, correspondente às amostras de soro de queijo em que se adicionaram os potenciadores da



TG, sulfato de cálcio e sulfato de zinco, figura III.59 poços 3 e 4, respetivamente, é mais intensa do que a mesma banda no caso em que se adicionaram os inibidores da TG, sulfato de cobre e sulfato de zinco, figura III.59 poços 5 e 6, respetivamente. Mais uma vez, e indo de encontro com os resultados obtidos na análise da figura III.58, na presença de inibidores a banda dos monómeros das proteínas do soro deveria ser maior do que a banda mesma banda mas com a adição dos potenciadores, uma vez que a TG, ao ser inibida pela adição dos iões metálicos, vai reticular menos proteína, logo há uma maior quantidade dos monómeros das proteínas em solução.<sup>33,35,73,109,110</sup>

Tudo isto acontece porque a TG, ao reagir com as proteínas do soro, forma polímeros de pesos moleculares elevados e, conseqüentemente, a diminuição da banda correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La.<sup>72,105,109,110,116,123</sup> Os polímeros de elevado peso molecular formados pela ação da TG na maioria das vezes, não conseguem entrar na rede do gel ficando retidos nos poços, ou não chegam a ser pipetados, não conseguindo entrar na ponta da pipeta, sendo muitas vezes visível a olho nu o aglomerado formado.<sup>35,109,123</sup>

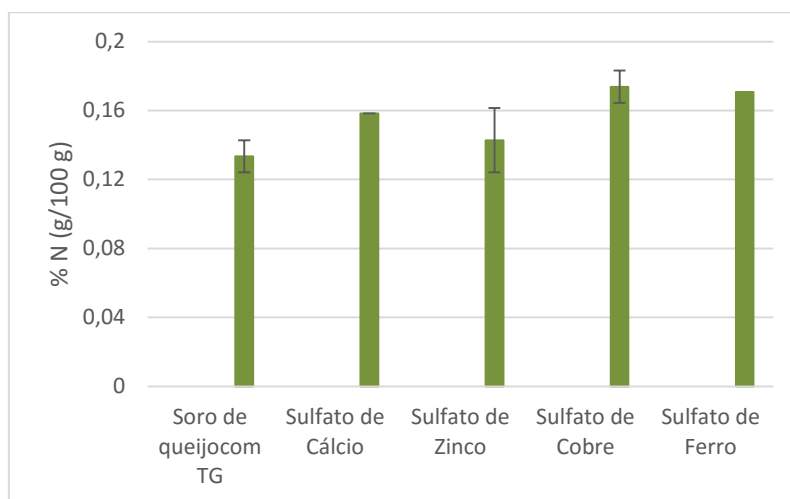
Aparece ainda no poço 5 (figura III.59), onde se adicionou sulfato de cobre, uma banda a entre os 36kDa e os 31kDa, que pode corresponder ao dímero da  $\beta$ -Lg justificando assim a banda de menor intensidade, correspondente aos monómeros da  $\beta$ -Lg e da  $\alpha$ -La, no fim da corrida. Podemos aferir então que neste caso, a diminuição da banda dos monómeros das proteínas anteriormente referidas não está associada ao aumento de reticulação mas sim ao aparecimento da  $\beta$ -Lg na forma de dímero.<sup>33,35,73,109,110</sup>

Os resultados obtidos pela técnica de SDS-PAGE não mostram nenhuma diferença significativa entre os inibidores e os potenciadores permitindo aferir que, assim como no FTIR, há inibição da TG nos quatro compostos em estudo.<sup>89,90</sup>

### 3.5.3. Análise do efeito das frações azotadas na proteólise

A proteólise, fenómeno bioquímico, afeta o desempenho funcional das proteínas. Uma vez que o soro de leite é altamente rico em proteínas, e dada a sua elevada importância a nível biológico e funcional, é importante conseguir monitorizar o grau de proteólise ao longo dos tratamentos aplicados ao soro em estudo, neste caso o soro de queijo que foi sujeito à adição de potenciadores e inibidores da TG.<sup>21,103,125</sup>

Realizou-se então o cálculo das frações de azoto correspondentes ao azoto solúvel em água (WSN) das amostras de soro de queijo em condições otimizadas de pré-tratamento e reticulação com a adição de potenciadores, sulfato de cálcio e sulfato de zinco, e inibidores, sulfato de cobre e sulfato de ferro, da TG, conforme indicado na figura III.60.



**Figura III.60:** Valores médios e desvio padrão correspondentes ao azoto solúvel em água (a verde), obtidos das amostras de soro de queijo a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH relativas ao estudo da adição de inibidores e potenciadores da TG.

Verifica-se que quando se adiciona à amostra de estudo o sulfato de cálcio e o sulfato de zinco, potenciadores da TG, e o sulfato de cobre e sulfato de ferro, os inibidores da TG, figura III.60, há um aumento da fração de azoto solúvel em água (WSN), isto é, há uma maior quantidade das pequenas proteínas, dos péptidos, dos resíduos de aminoácidos e do azoto livre em solução, quando comparados com a mesma amostra de soro de queijo mas sem adição de fortificantes alimentares.<sup>21,101,103</sup> O aumento destas frações proteicas em solução indica que o rendimento da reação de reticulação baixou (19% com adição de sulfato de cálcio, 7% com adição de sulfato de zinco, 30% com adição de sulfato de cobre e 28% com adição de sulfato de ferro) uma vez que, para ocorrer reticulação enzimática pela TG, as proteínas têm que estabelecer ligações entre si formando polímeros. Estes resultados vêm corroborar os resultados anteriores, indicando que as quatro amostras em estudo inibem a reação de reticulação das proteínas do soro pela TG.<sup>35,109,123</sup>

Em suma, o sulfato de cobre é o que apresenta uma inibição superior da atividade da TG, corroborando os resultados do FTIR, e o sulfato de cálcio e sulfato de zinco, indicados por Macedo<sup>90</sup> como potenciadores, provam ser inibidores da TG, nas condições reacionais usadas nas nossas experiências.

## Conclusão

A indústria do soro de leite deixou de ser um encargo ambiental e passou a ter um contributo chave para a indústria de laticínios. Constitui numa abordagem inovadora e progressiva para o desenvolvimento de produtos que atendem às necessidades de aplicações nutricionais e funcionais. Os concentrados proteicos em pó estão a evoluir para um ingrediente de valor nutricional excelente com vantagens e aplicações específicas.

A reticulação enzimática é uma técnica que tem sido testada e implementada na indústria alimentar onde as enzimas substituem os produtos químicos e apresentam uma elevada especificidade, condições reacionais suaves e baixo risco de formação de produtos tóxicos. Recentemente, tem-se testado esta técnica com a finalidade de reduzir a alergenidade da  $\beta$ -lactoglobulina recorrendo à transglutaminase (TG). Esta enzima, que já é amplamente usada na indústria de laticínios, atua sobre a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La, assim como sobre as restantes proteínas do soro de leite, promovendo a formação de ligações cruzadas intramoleculares e intermoleculares  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil) lisina.

As técnicas de análise utilizadas formam a espectroscopia de FTIR (Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier), a eletroforese de proteínas em SDS-PAGE e a metodologia de Kuchroo e Fox para a quantificação das diversas frações solúveis de azoto. Esta última permite quantificar proteínas e pequenos péptidos em solução através da determinação dos azotos em solução com diferentes solventes. A análise baseou-se na diminuição das proteínas em solução como indicativo de desnaturação, devido à formação de agregados de proteínas, e como indicativo de reticulação, devido à formação dos polímeros proteicos reticulados.

A eletroforese em géis de poliacrilamida com SDS permite seguir igualmente a desnaturação das proteínas pela diminuição da intensidade das bandas correspondentes aos monómeros e dímeros proteicos, e ao aparecimento das bandas correspondentes aos agregados moleculares, no caso do estudo da desnaturação, e ao aparecimento de bandas no topo do gel, ou de retenção nos poços, devido à formação de polímeros de elevado peso molecular através da reação de reticulação das proteínas do soro pela TG:

A espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR), permite obter, através da aplicação de tratamentos matemáticos ao espectro obtido, a desconvolução dos espectros das amostras na região de amida I. Através desta desconvolução, podemos atribuir cada banda a uma estrutura secundária, folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares, hélices- $\alpha$  e *random coil*. Contudo, na literatura há pouca informação relativamente à atribuição das bandas a estruturas secundárias. Cada autor apenas refere a banda e estrutura secundária associada, que é de maior interesse para o estudo em questão. Deste modo, e após uma vasta pesquisa realizada com os diversos valores de números de onda associados a cada estrutura secundária de diversos artigos científicos publicados, foi possível estabelecer, para cada estrutura, um intervalo de valores de número de onda adequado onde essa mesma estrutura pode aparecer.

Testaram-se as cinco condições de pré-tratamento das amostras em estudo que se baseiam no aquecimento a 80°C da amostra durante 1h e no acerto de pH a pH 7. O aquecimento é necessário para que ocorra a desnaturação da proteína, uma vez que a  $\beta$ -Lg apresenta uma estrutura 3D compacta, expondo os epítomos alergénicos até então escondidos e permitindo a reticulação pela TG. O acerto de pH é necessário uma vez que a TG apresenta um pH ótimo de funcionamento a pH=7 e enquanto as amostras de  $\beta$ -Lg, após a dissolução em D<sub>2</sub>O (solvente usado nos estudos com FTIR, para evitar a interferência das vibrações da água na banda de amida I), apresentam sempre um pH superior a 7, as amostras de soro comercial e de soro de queijo apresentam sempre um pH≈6 ou pH<6, respetivamente.

O aquecimento das amostras provoca alterações significativas na região de amida I dos espectros de FTIR denotadas pela diminuição das hélices- $\alpha$  uma vez que, quando se sujeitam as proteínas a temperaturas superiores a 70°C durante um determinado intervalo de tempo, ocorre a perda da estrutura nativa da proteína, isto é, ocorre a desnaturação das proteínas. A desnaturação proteica provoca também a quebra de ligações intramoleculares nas proteínas. Outra alteração provocada na região de amida I é o aumento das folhas- $\beta$  intermoleculares. Isto acontece porque as estruturas desnaturadas pelo calor agrupam-se e estabelecem ligações entre si de forma a formarem aglomerados.

As alterações provocadas pela reticulação enzimática das proteínas do soro de leite pela TG já não são tão notórias na região de amida I do espectro de FTIR. Isto prende-se pelo baixo número de ligações criadas pela reticulação que interferem com a cadeia central das proteínas. Sabe-se que a reação de reticulação altera o microambiente em torno do grupo carbonilo da cadeia lateral da glutamina que vai reagir com a lisina potenciando a formação de ligações  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)lisina intermoleculares e intramoleculares, conforme ocorram entre moléculas diferentes ou dentro da mesma molécula, respetivamente. Deste modo, aumenta a probabilidade da formação de novas ligações de pontes de hidrogénio que também podem ser intermoleculares ou intramoleculares. Assim, ocorre uma reestruturação das estruturas secundárias das proteínas em solução onde há formação de novas folhas- $\beta$  intermoleculares e intramoleculares.

Iniciou-se o estudo da reticulação das proteínas do soro de leite com a análise da proteína pura,  $\beta$ -Lg, uma vez que, para além de ser a proteína dominante do soro, é a proteína que mais alergenidade apresenta e que revela uma melhor afinidade pela TG. Verificou-se que as melhores condições de pré-tratamento são com aquecimento e acerto de pH, por qualquer ordem. De seguida, estudou-se a adição de diferentes quantidades de TG às melhores condições de pré-tratamento definidas e verificou-se que a condição à qual se obteve melhores resultados foi a que sujeitou a amostra de  $\beta$ -Lg a aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de proteína. Realizaram-se então dois estudos cinéticos, um com 100U de TG/g de proteína onde não se conseguiram retirar conclusões relevantes uma vez que a reação ocorreu logo na primeira hora de cinética, decidiu-se então testar a mesma condição mas na presença de 25U de TG/g de proteína. Para esta quantidade menor de TG, verificou-se

que a reação de reticulação atinge a sua melhor eficácia entre os 90 e os 180 minutos de reação.

No estudo realizado com soro comercial selecionou-se, das cinco condições de pré-tratamento estudadas, as condições com aquecimento seguido de acerto de pH e com acerto de pH seguido de aquecimento. Posteriormente realizou-se um novo estudo onde se adicionou às cinco condições em estudo o equivalente a 50U de TG/g de proteínas em solução uma vez que foi a quantidade de enzima mais habitualmente referida na literatura. Após a reação de reticulação ocorrer, que teve a duração de 12h uma vez que a TG se encontra inativa após as 12h de reação, verificou-se novamente que as duas melhores condições eram com aquecimento seguido de acerto de pH e com acerto de pH seguido de aquecimento, sendo que a primeira foi onde se registou uma maior eficiência da reação de reticulação, tal como avaliada pela maior quantidade de folhas- $\beta$  em solução.

Um dos estudos cinéticos realizados, onde a reação de reticulação ocorreu na presença de 50U de TG/g de proteína em solução com a condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento, verificou-se mais uma vez que a reação de reticulação ocorre logo nas primeiras horas de reação, contudo é às 10 horas que se regista um maior número de folhas- $\beta$  em solução, isto é, onde se regista uma melhor eficiência da reação de reticulação.

Outro estudo cinético foi realizado na presença de 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH durante 10h. Aqui verificou-se novamente que a reação de reticulação ocorre no início do estudo cinético e, mesmo havendo pouca variação nos valores de folhas- $\beta$ , é às 8 horas que se regista a sua maior influência. Sendo assim é após 8 horas de reação, nas condições anteriormente referidas, que se regista um maior rendimento da reação.

Relativamente ao soro de queijo realizou-se o estudo cinético com a condição de pré-tratamento com aquecimento com acerto de pH na presença de 100U de TG/g de proteína e verificou-se novamente que a reação de reticulação ocorre logo nas primeiras horas da reação, impossibilitando, novamente, definir o perfil cinético, mas verificou-se que foi às seis horas de reação onde se registou a maior quantidade de folhas- $\beta$ , isto é, onde existe um melhor rendimento da reação de reticulação.

Realizou-se também o estudo da adição de potenciadores, sulfato de cálcio e sulfato de zinco, e de inibidores, sulfato de cobre e sulfato de ferro, da atividade da TG, segundo a literatura. Contudo os resultados obtidos pelas diversas técnicas apontam os iões de cálcio e de zinco como inibidores da TG, assim como os iões de cobre e de ferro. Onde, segundo a análise realizada pelo FTIR, o sulfato de ferro reduziu cerca de 7,0%, o sulfato de cálcio reduziu 7,4%, o sulfato de zinco reduziu 8,8% e o sulfato de cobre reduziu 13,0% a reação de reticulação das proteínas do soro pela TG. Segundo a análise realizada pela determinação dos azotos solúveis em água verificou-se, novamente, que o sulfato de cobre é o que inibe mais a atividade da TG, reduzindo o rendimento da reação em 30,2%, e que os restantes iões também

reduzem o rendimento da reação de reticulação, sendo que o sulfato de ferro reduz em 27,9%, o sulfato de cálcio reduz em 18,6% e o sulfato de zinco reduz em 7,0%.

É de salientar que nas análises realizadas pelo FTIR em ambos os soros de leite, soro comercial e soro de queijo, não se registou a influência das estruturas *random coil*. O facto de no soro de leite existir uma grande variedade de proteínas em solução e de todas, com maior ênfase a  $\beta$ -Lg e a  $\alpha$ -La, reticularem com a TG, provavelmente faz com que o aumento de folhas- $\beta$  criados pela formação de ligações entre as moléculas de proteínas de forma a formarem os polímeros, camufle a influência das estruturas *random coil* impedindo que sejam detetadas pela técnica utilizada.

## Perspetivas Futuras

Os estudos cinéticos apresentados nas três amostras em estudo,  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), soro comercial e soro de queijo, permitiram concluir que a reação de reticulação das proteínas do soro pela transglutaminase (TG) ocorreu logo entre a primeira hora e a segunda hora de reação. Será necessário realizar novos estudos nas mesmas condições de pré-tratamento otimizadas mas com quantidades inferiores de TG, de modo a possibilitar o estabelecimento de um perfil cinético detalhado. Deste modo, será possível aferir com mais certeza quais as condições otimizadas da reação de reticulação em cada caso de estudo podendo diminuir os custos associados uma vez que se pretende a inserção desta metodologia na indústria dos lacticínios.

A  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -La), sendo a segunda maior proteína com potencial alergénico do soro de leite e apresentando uma elevada afinidade para com a TG, deverá ser também estudada, no seu estado nativo, de forma análoga ao estudo realizado com a  $\beta$ -Lg.

O modo como os fortificantes, que são vastamente utilizados nesta indústria, interferem com a TG e consequentemente com a reação de reticulação devem ser estudados e analisados. É necessário verificar de que forma influenciam positiva ou negativamente a atividade da TG de forma a ser possível verificar qual a melhor quantidade de TG a utilizar em cada um dos casos em estudo. No caso de estudo já realizado será necessário aumentar a gama de quantidades de TG a adicionar de forma a perceber melhor como estes interferem com a enzima uma vez que os resultados obtidos contradizem parte da literatura existente.

Como todo este trabalho visa a inserção da técnica de reticulação enzimática pela TG das proteínas do soro de leite, com a finalidade de reduzir a alergenidade das proteínas do soro, na indústria de lacticínios é necessário averiguar se efetivamente, após a reticulação das proteínas, não é desencadeada nenhuma resposta alérgica. Para tal é importante realizar testes de ELISA, por exemplo, com as amostras de soro de leite, comercial e de queijo, assim como das proteínas puras, reticuladas com a TG, nas condições otimizadas, de forma a verificar se a resposta alérgica é ou não desencadeada na presença dos anticorpos específicos.





## Bibliografia

- (1) Lagrange, V.; Whitsett, D.; Burris, C. *J. Food Sci.* **2015**, *80* (S1), A16.
- (2) Gerhart, M.; Schottenheimer, M. *Wellness Foods Eur.* **2013**, 30.
- (3) El-Agamy, E. I. *Small Rumin. Res.* **2007**, *68* (1–2), 64.
- (4) Haraguchi, F. K.; De Abreu, W. C.; De Paula, H. *Rev. Nutr.* **2006**, *19* (4), 479.
- (5) Capitan, F.; Robu, A. C.; Schiopu, C.; Ilie, C.; Chait, B. T.; Przybylski, M.; Zamfir, A. D. *Amino Acids* **2015**, *47* (11), 2399.
- (6) Bu, G.; Luo, Y.; Chen, F.; Liu, K.; Zhu, T. *Dairy Sci. Technol.* **2013**, *93* (3), 211.
- (7) Heena Jalal, Parveez Ahmad Para, Subha Ganguly, Sucharitha Devi, Mohammad Mansoor Bhat, S. A. B. and K. Q. *World J. Biol. Med. Sci.* **2016**, *3* (1), 23.
- (8) Barltrop, D.; Oppe, T. E. *Archives of Disease in Childhood.* **1973**, *48*, 580.
- (9) Münchbach, M.; Gerstner, G. *Food Marketing & Technology*, **2010**, No.72 February, 4.
- (10) Kazem-Farzandi, N.; Taheri-Kafrani, A.; Haertlé, T. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *81*, 340.
- (11) Taheri-Kafrani, A.; Tavakkoli Koupaie, N.; Haertlé, T. *J. Biotechnol.* **2015**, *212*, 181.
- (12) Duan, C. C.; Li, A. L.; Yang, L. J.; Zhao, R.; Fan, W. G.; Huo, G. C. *Iran. J. Allergy, Asthma Immunol.* **2014**, *13* (1), 26.
- (13) Martinez, M. J.; Martos, G.; Molina, E.; Pilosof, A. M. R. *Food Chem.* **2016**, *192*, 943.
- (14) Micinskia, J.; Kowalskil, I. M.; Zwierchowska, G.; Szarelt, J.; Pieroyński, B.; Zablocka, E. *Polish Ann. Med.* **2013**, *20* (1), 69.
- (15) Sharma S, Kumar P, Betzel C, S. T. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **2001**, *756* (183–187), 183.
- (16) Stojadinovic, M.; Pieters, R.; Smit, J.; Velickovic, T. C. *Toxicol. Sci.* **2014**, *140* (1), 224.
- (17) Composição geral do leite de vaca UHT gordo, *Serviço Nacional de Saúde*. Consultado em 4 de Setembro de 2017: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?9>
- (18) Fernando, A. L.; Aguiar, S. S. De; Veloso, M. I.; Franco, R. *Journal of Dairy and Veterinary Sciences*, **2017**, v.2 (5), 1.
- (19) Douglas, F. W.; Rainey, N. H.; Wong, N. P.; Edmondson, L. F.; LaCroix, D. E. *J. Dairy Sci.* **1981**, *64* (9), 1785.
- (20) Gaucheron, F. *Trends Food Sci. Technol.* **2001**, *11* (11), 403.
- (21) Patel, S. *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52* (11), 6847.
- (22) Farrell, H. M.; Jimenez-Flores, R.; Bleck, G. T.; Brown, E. M.; Butler, J. E.; Creamer, L. K.; Hicks, C. L.; Hollar, C. M.; Ng-Kwai-Hang, K. F.; Swaisgood, H. E. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87* (6), 1641.
- (23) Kilara, A.; Panyam, D. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, *43* (6), 607.
- (24) Cabrera-Chávez, F.; de la Barca, A. M. C. *Nutrition* **2009**, *25* (6), 715.
- (25) Tauzin, J.; Miclo, L.; Gaillard, J. L. *FEBS Lett.* **2002**, *531*, 369.
- (26) Wen-qiong, W.; Lan-wei, Z.; Xue, H.; Yi, L. *Food Chem.* **2017**, *215*, 31.
- (27) Jensen, T.; Bechshoeft, R. L.; Giacalone, D.; Otto, M. H.; Castro-Mejía, J.; Bin Ahmad, H. F.; Reitelsheder, S.; Jespersen, A. P. *Appetite* **2016**, *107*, 285.
- (28) Adams, R. L.; Broughton, K. S. *Ann. Nutr. Metab.* **2016**, *56*.
- (29) Lacroix, I. M. E.; Li-Chan, E. C. Y. *Peptides* **2014**, *54*, 39.
- (30) Ma, J.; Jesudason, D. R.; Stevens, J. E.; Keogh, J. B.; Jones, K. L.; Clifton, P. M.; Horowitz, M.; Rayner, C. K. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2015**, *108* (2), e31.
- (31) Goudarzi, M.; Madadlou, A. *Int. Dairy J.* **2013**, *33* (1), 62.
- (32) Nilsson, M.; Stenberg, M.; Frid, A. H.; Holst, J. J. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *80* (5), 1246.
- (33) Aich, R.; Batabyal, S.; Joardar, S. N. *Vet. World* **2015**, *8* (5), 621.
- (34) Zhao, L. L.; Wang, X. L.; Tian, Q.; Mao, X. Y. *J. Dairy Sci.* **2016**, *1*.
- (35) Agyare, K. K.; Damodaran, S. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (3), 1946.
- (36) Zheng, G.; Liu, H.; Zhu, Z.; Zheng, J.; Liu, A. *Food Chem.* **2016**, *204*, 246.
- (37) Brownlow, S.; Cabral, J. H. M.; Cooper, R.; Flower, D. R.; Yewdall, S. J.; Polikarpov, I.; North, A. C.; Sawyer, L. *Structure* **1997**, *5* (4), 481.
- (38) Krämer, A. C.; Thulstrup, P. W.; Lund, M. N.; Davies, M. J. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *97*, 544.
- (39) Fang, Y.; Dalglish, D. G. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *196* (2), 292.
- (40) Lefèvre, T.; Subirade, M. *Food Hydrocoll.* **2001**, *15* (4–6), 365.
- (41) Hosseini-nia, T.; Ismail, A. A.; Kubow, S. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (11), 4537.
- (42) Fang, Y.; Dalglish, D. G. *Food Hydrocoll.* **1998**, *12* (2), 121.
- (43) Kinsella, J. E.; Whitehead, D. M. *Adv. Food Nutr. Res.* **1989**, *33* (C), 343.

- (44) Pike, A. C.; Brew, K.; Acharya, K. R. *Structure* **1996**, 4 (6), 691.
- (45) Tanimoto, S. Y.; Tanimoto, S. Y.; Kinsella, J. E.; Kinsella, J. E. *J. Agric. Food Chem.* **1988**, 36 (1971), 281.
- (46) Anderson, G. H.; Moore, S. E. *J. Nutr.* **2004**, 134 (4), 974.
- (47) Neelima; Sharma, R.; Rajput, Y. S.; Mann, B. *Dairy Sci. Technol.* **2013**, 93 (1), 21.
- (48) Kelleher, S.; Chatterton, D.; Nielsen, K.; Lönnerdal, B. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, 77, 1261.
- (49) Javier Izquierdo, F.; Alli, I.; Gómez, R.; Ramaswamy, H. S.; Yaylayan, V. *Food Chem.* **2005**, 92 (4), 713.
- (50) El Mecherfi, K. E.; Rouaud, O.; Curet, S.; Negaoui, H.; Chobert, J. M.; Kheroua, O.; Saidi, D.; Haertlé, T. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2015**, 50 (2), 356.
- (51) Izquierdo, F. J.; Peñas, E.; Baeza, M. L.; Gomez, R. *Int. Dairy J.* **2008**, 18 (9), 918.
- (52) Rial-Otero, R.; Carreira, R. J.; Cordeiro, F. M.; Moro, A. J.; Fernandes, L.; Moura, I.; Capelo, J. L. *J. Proteome Res.* **2007**, 6 (2), 909.
- (53) Ashokkumar, M.; Sunartio, D.; Kentish, S.; Mawson, R.; Simons, L.; Vilkhu, K.; Versteeg, C. (Kees). *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2008**, 9 (2), 155.
- (54) Santos, H. M.; Capelo, J. L. *Talanta* **2007**, 73 (5), 795.
- (55) Martinho, J.E.T.C.; Martinez, J.L.C. *Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, FCT/UNL.* **2008**.
- (56) Bu, G.; Luo, Y.; Zheng, Z.; Zheng, H. *Food Agric. Immunol.* **2009**, 20 (3), 195.
- (57) Davis, P. J.; Smales, C. M.; James, D. C. *Allergy* **2001**, 56 Suppl 6, 56.
- (58) Datta, N.; Deeth, H. C. *Aust. J. Dairy Technol.* **1999**, 54 (February), 41.
- (59) Subirade, M.; Loupil, F.; Allain, A. F.; Paquin, P. *Int. Dairy J.* **1998**, 8 (2), 135.
- (60) Zeece, M.; Huppertz, T.; Kelly, A. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2008**, 9 (1), 62.
- (61) Huppertz, T.; Fox, P. F.; Kelly, A. L. *J. Dairy Res.* **2004**, 71 (1), 97.
- (62) López-Fandiño, R. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2006**, 46 (4), 351.
- (63) Peñas, E.; Restani, P.; Ballabio, C.; Préstamo, G.; Fiocchi, A.; Gomez, R. *J. Food Prot.* **2006**, 69 (7), 1707.
- (64) Pyo, M. C.; Yang, S.-Y.; Chun, S.-H.; Oh, N. S.; Lee, K.-W. *Biol. Pharm. Bull.* **2016**, 39 (9), 1437.
- (65) Hattori, M.; Nagasawa, K.; Ametani, A.; Kaminogawa, S. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42 2120.
- (66) Hattori, M.; Nagasawa, K.; Ohgata, K.; Sone, N.; Fukuda, a; Matsuda, H.; Takahashi, K. *Bioconjug. Chem.* **2000**, 11, 84.
- (67) Kobayashi, K.; Hirano, A.; Ohta, A.; Yoshida, T.; Takahashi, K.; Hattori, M. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (2), 823.
- (68) Hattori, M.; Numamoto, K.; Kobayashi, K.; Takahashi, K. *J Agric Food Chem* **2000**, 48 (6), 2050.
- (69) Bu, G.; Lu, J.; Zheng, Z.; Luo, Y. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, 89 (14), 2428.
- (70) Bu, G.; Luo, Y.; Lu, J.; Zhang, Y. *Food Agric. Immunol.* **2010**, 21 (May), 143.
- (71) Meisel, H. *Biofactors* **2004**, 21 (1–4), 55.
- (72) Eissa, A. S.; Puhl, C.; Kadla, J. F.; Khan, S. A. **2006**, 1707.
- (73) Eduardo Olivier, C.; Regiane Patussi dos Santos Lima, I.; dos Santos, G.; Grayce Katlen Moreno da Silva, I.; Sô nia Letícia Silva Lorena, I. *Clinics* **2012**, 67 (10), 1171.
- (74) Gauthier, S. F.; Pouliot, Y. *J. Dairy Sci.* **2003**, 86 (July 2002), E78.
- (75) Bertrand-Harb, C.; Baday, A.; Dalgalarondo, M.; Chobert, J. M.; Haertlé, T. *Nahrung - Food* **2002**, 46 (4), 283.
- (76) Bonomi, F.; Fiocchi, A.; Frøkiaer, H.; Gaiaschi, A.; Iametti, S.; Poiesi, C.; Rasmussen, P.; Restani, P.; Rovere, P. *J. Dairy Res.* **2003**, 70 (1), 51.
- (77) Monaci, L.; Tregoat, V.; Van Hengel, A. J.; Anklam, E. *Milk allergens, their characteristics and their detection in food: A review*; 2006; Vol. 223.
- (78) Raksakulthai, R.; Haard, N. F. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2003**, 43 (4), 401.
- (79) Peyron, S.; Mouécoucou, J.; Frémont, S.; Sanchez, C.; Gontard, N. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54 (15), 5643.
- (80) Rodriguez-Nogales, J. M. *Int. Dairy J.* **2006**, 16 (1), 26.
- (81) Regulation (EC) No 1332/2008 - European Parliament and Council of the European Union. *Off. J. Eur. Union L* **354** **2008**, 51 (1332), 7.
- (82) European Comission: Directorate - General For Health and Food Safety. *Safety of the Food Chain* **2016**, Version4, 1-35.
- (83) Báez, G. D.; Moro, A.; Ballerini, G. A.; Busti, P. A.; Delorenzi, N. J. *Food Hydrocoll.* **2011**, 25 (7), 1758.

- (84) Kieliszek, M.; Misiewicz, A. *Folia Microbiol. (Praha)*. **2014**, 59 (3), 241.
- (85) Fernandes, C. G.; Plácido, D.; Lousa, D.; Brito, J. A.; Isidro, A.; Soares, C. M.; Pohl, J.; Carrondo, M. A.; Archer, M.; Henriques, A. O. *ACS*. **2015**; Vol. 54.
- (86) Rodriguez-Nogales, J. M. *Process Biochem.* **2006**, 41 (2), 430.
- (87) Torres, M. A.; Sato, K.; Lobo, N. F.; de Souza Queiroz, S. *Rev. saúde pública* **1995**, 29 (4), 301.
- (88) Mendes, F. Q.; Gomes, J. C.; Barbosa, T. S.; Sartori, M. A.; Oliveira, M. G. de A. *Bol. do Cent. Pesqui. Process. Aliment.* **2008**, 26 (1), 93.
- (89) Ando, H.; Adachi, M.; Umeda, K.; Matsuura, A.; Uchio, R.; Tanaka, H.; Motoki, M. **2017**, 1369 (May).
- (90) Macedo, J. A.; Sette, L. D. **2010**, 308.
- (91) Lefevre, T.; Subirade, M. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1999**, 34 (5–6), 419.
- (92) Arrondo, J. L. R.; Muga, A.; Castresana, J.; Bernabeu, C.; Goñi, F. M. *FEBS Lett.* **1989**, 252 (1–2), 118.
- (93) Jackson, M.; Mantsch, H. H. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 30 (2), 95.
- (94) Barth, A. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **2007**, 1767 (9), 1073.
- (95) Allain, A. F.; Paquin, P.; Subirade, M. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 26 (5), 337.
- (96) Miller, L. M.; Bourassa, M. W.; Smith, R. J. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2013**, 1828 (10), 2339.
- (97) Byler, D. M.; Purcell, J. M.; Errc, A. *SPIE - Fourier Transform Spectroscopy*. **1989**, 1145, 415-417.
- (98) Bandekar, J. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* **1992**, 1120 (2), 123.
- (99) Nevskaya, N. A.; Chirgadze, Y. N. *Biopolymers* **1976**, 15 (4), 637.
- (100) Oberg, K. A.; Ruysschaert, J.-M.; Goormaghtigh, E. *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271 (14), 2937.
- (101) Johansen, A. G.; Vegarud, G. E.; Skeie, S. *Int. Dairy J.* **2002**, 12 (7), 621.
- (102) Rank, T. C.; Grappin, R.; Olson, N. F. *J. Dairy Sci.* **1985**, 68 (4), 801.
- (103) Kruchoo, C. N. F.; Fox, P. F. *Milchwissenschaft* **1982**, 37 (14), 331.
- (104) Mcsweeney, P.; Pf. *Le Lait, INRA Ed.* **1997**, 77 (1), 41.
- (105) Eissa, A. S.; Bislam, S.; Khan, S. A. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (14), 4456.
- (106) Eissa, A. S.; Khan, S. A. *Food Hydrocoll.* **2006**, 20 (4), 543.
- (107) Eissa, A. S.; Khan, S. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53 (12), 5010.
- (108) Clare, D. A.; Daubert, C. R. *J. Food Sci.* **2011**, 76 (4), 369.
- (109) Villas-Boas, M. B.; Vieira, K. P.; Trevizan, G.; de Lima Zollner, R.; Netto, F. M. *Int. Dairy J.* **2010**, 20 (6), 386.
- (110) Sabadin, I. S.; Villas-Boas, M. B.; de Lima Zollner, R.; Netto, F. M. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, 235 (5), 801.
- (111) Partschefeld, C.; Richter, S.; Schwarzenbolz, U.; Henle, T. *Biotechnol. J.* **2007**, 2 (4), 462.
- (112) Howell, N. K.; Arteaga, G.; Nakai, S.; Li-Chan, E. C. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (3), 924.
- (113) Bouraoui, M.; Nakai, S.; Li-Chan, E. *Food Res. Int.* **1997**, 30 (1), 65.
- (114) BioRad. *BioRad* **2011**, 5.
- (115) BioRad. *BioRad. Edition, S. New York* **1990**, 680 (161), 1.
- (116) Jovanovic, S.; Barac, M.; Macej, O.; Vucic, T.; Lacnjevac, C. *Sensors* **2007**, 7, 371.
- (117) Aitken, C. E.; Marshall, R. A.; Puglisi, J. D. *Biophys. J.* **2008**, 94 (5), 1826.
- (118) Aboumahmoud, R.; Savello, P. *J. Dairy Sci.* **1990**, 73 (2), 256.
- (119) Nieuwenhuizen, W. F.; Dekker, H. L.; Gröneveld, T.; De Koster, C. G.; De Jong, G. A. H. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, 85 (3), 248.
- (120) Tanfani, F.; Bertoli, E.; Signorin, M.; Bergamini, C. M.; Biochirnica, I.; Ancona, U. **1993**, 505, 499.
- (121) Motoki, M.; Seguro, K. *Trends Food Sci. Technol.* **1998**, 9 (5), 204.
- (122) Jong, G. H. A. de; Koppelman, S. J. *J. Food Sci.* **2002**, 67 (8), 2798.
- (123) Villas-Boas, M. B.; Fernandes, M. A.; Zollner, R. de L.; Netto, F. M. *Int. Dairy J.* **2012**, 25 (2), 123.
- (124) Fling, S. P.; Gregerson, D. S. *Anal. Biochem.* **1986**, 155 (1), 83.
- (125) Robinson, R. K.; Tamime, A. Y. *Fermented Milks* **2007**, 1.
- (126) Aisen, P.; Leibman, A. *BBA - Protein Struct.* **1972**, 257 (2), 314.
- (127) Singh, A. K.; Singh, N.; Sharma, S.; Singh, S. B.; Kaur, P.; Bhushan, A.; Srinivasan, A.; Singh, T. P. *J. Mol. Biol.* **2008**, 376 (4), 1060.

- (128) Veloso, M.I.; Aguiar, S.S.; Franco, R.; Fernando, A.L. *Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, FCT/UNL*. **2017**.
- (129) Veloso, M.I.; Aguiar, S.S.; Franco, R.; Fernando, A.L.; In: Sanches-Silva, A.; Vilarinho, F.; Santos, M.; Andrea, M. *Livro de Resumos do 4º Spass: do Nutriente à Embalagem - Inovação e Desafios*. **2017**, 52-53.
- (130) Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. *Mol. Immunol.* **2012**, 52 (3–4), 174.
- (131) Schultz, K. C.; Supekova, L.; Ryu, Y.; Xie, J.; Perera, R.; Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128 (43), 13984.
- (132) Marcus, Y. *IUPAC Commission on Electroanalytical Chemistry*, **1985** 57(10), 1491.
- (133) Kauffmann, E.; Darnton, N. C.; Austin, R. H.; Batt, C.; Gerwert, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, 98, 6646.
- (134) Oberg, K. A.; Fink, A. L. *Anal. Biochem.* **1998**, 256 (1), 92.
- (135) Rigler, P.; Ulrich, W. P.; Hoffmann, P.; Mayer, M.; Vogel, H. *ChemPhysChem* **2003**, 4 (3), 268.
- (136) Torii, H.; Tasumi, M. *J. Chem. Phys.* **1992**, 96 (5), 3379.
- (137) Moore, W. H.; Krimm, S. *Biopolymers* **1976**, 15 (12NA-NA–770103–770104), 2465.
- (138) Lee, S.-H.; Krimm, S. *Chem. Phys.* **1998**, 230 (2–3), 277.
- (139) Kubelka, J.; Keiderling, T. a. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123 (17), 12048.
- (140) Wessel, D.; Flügge, U. I. *Anal. Biochem.* **1984**, 138 (1), 141.
- (141) Shapiro, a L.; Viñuela, E.; Maizel, J. V. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, 28 (5), 815.
- (142) Schägger, H.; von Jagow, G. *Anal. Biochem.* **1987**, 166 (2), 368.
- (143) Rath, A.; Glibowicka, M.; Nadeau, V. G.; Chen, G.; Deber, C. M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, 106 (6), 1760.

## Anexos

### 1. Espectroscopia de Infravermelhos por Transformada de Fourier: FTIR

A técnica de espectroscopia de Infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR) tem tido uma grande aplicabilidade em diversas áreas da ciência. Numa molécula, o efeito dominante que determina as frequências vibratórias através dos pontos fortes das ligações vibratórias e das massas dos átomos vibratórios, definem a sua estrutura química.<sup>94</sup>

A absorção da radiação infravermelha excita as transições vibracionais das moléculas. A frequência vibracional e a probabilidade de absorção das moléculas são influenciadas pelos efeitos intramoleculares e intramoleculares que dependem da força e da polaridade das ligações vibratórias.<sup>94</sup>

Uma banda de absorção de infravermelhos é determinada pelas massas vibratórias, pelo tipo de ligação, pela posição exata por efeitos de remoção ou doação de eletrões através do ambiente intermolecular e intramolecular e por acoplamento com outras vibrações, onde a força de absorção aumenta proporcionalmente com o aumento da polaridade das ligações vibratórias.<sup>94</sup>

Em suma, todas as ligações polares contribuem para a absorção do infravermelho, o que se pode tornar num inconveniente uma vez que, no estudo de moléculas maiores, o espectro obtido é composto por muitas bandas sobrepostas que podem mascarar muitas informações sobre a molécula em estudo. Contudo, o facto de não ser necessário fazer nenhuma atribuição específica à amostra em estudo para ser detetável é uma vantagem da técnica de FTIR.<sup>94,131</sup>

O espectro de infravermelhos é traçado contra o inverso do comprimento de onda que é proporcional à transição de energia que é expressa em  $\text{cm}^{-1}$ . Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), as coordenadas horizontais do espectro de FTIR devem ser apresentadas de números de onda altos para números de onda baixos.<sup>94,132</sup>

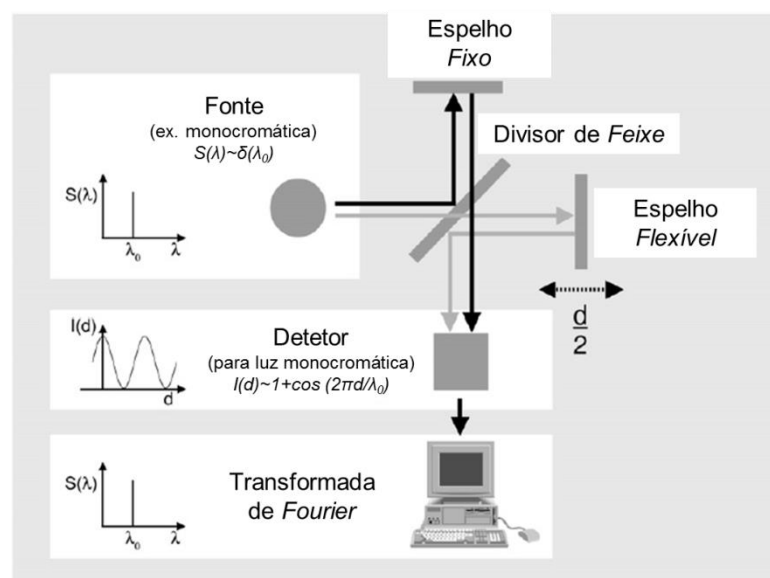
Do espectro de infravermelhos pode ser retirada diversa informação como é o caso da estrutura química dos grupos vibracionais, das propriedades químicas dos grupos vizinhos numa molécula, dos estados de redução e oxidação, dos parâmetros de ligação, dos ângulos de ligação, das ligações de hidrogénio, dos campos elétricos e da liberdade conformacional de uma molécula ou proteína.<sup>94</sup>

#### 1.1. Espectrómetros de FTIR

Os espectrómetros de infravermelhos de transformada de Fourier apresentam diversas vantagens, para além de serem equipamentos de custo reduzido, apresenta uma coleta de dados rápida, pode gravar um espectro em 10ms, possui uma elevada intensidade de luz no detetor e consequentemente apresenta uma razão sinal/ruído elevada.



Os espectrómetros de FTIR, ou espectrómetros de infravermelhos, possuem um interferómetro, como o interferómetro de Michelson, um espelho fixo e móvel onde, o último, gera uma diferença de percurso ótico variável entre dois feixes que fornece um sinal de deteção que contém a informação espectral, figura 1.<sup>94</sup>



**Figura 1:** Esquema do espectrómetro de FTIR, baseado no esquema de Barth 2007<sup>94</sup>.

A luz, que é emitida a partir de uma fonte de luz inserida no espectrómetro, é dividida por um divisor de feixe onde, aproximadamente metade, é refletida para o espelho fixo e é refletida novamente para o divisor de feixes, onde, aproximadamente 50%, passa para alcançar o detetor, setas a preto na figura 1. A outra parte do feixe de luz inicial, passa o divisor de feixe e é refletida pelo espelho móvel de volta ao divisor de feixes, onde, aproximadamente metade, é refletido para o detetor, setas a cinza na figura 1. Quando os dois feixes juntam novamente, interferem entre si e geram uma interferência construtiva ou destrutiva dependendo da diferença de caminho ótico percorrido,  $d$ .<sup>94</sup>

O aparelho mede a intensidade da luz em função da posição do espelho móvel, interferómetro, que é a transformada de *Fourier* do espectro. Os dados medidos são sujeitos a uma segunda transformada de *Fourier* realizada por um computador, que converte os dados medidos num espectro.<sup>94</sup> O espectro produzido,  $S(\lambda)$ , é descrito através de uma função delta localizada em  $\lambda_0$ . Obtém-se uma interferência construtiva ou destrutiva no detetor, que varia consoante a posição do espelho, e onde o sinal de deteção,  $I(d)$ , varia como uma função cosseno com a posição do espelho, que determina a diferença de caminho ótico,  $d$ . A função de cosseno e a função delta que descrevem o espectro monocromático estão relacionadas através de uma transformada de *Fourier*. Por ultimo, é aplicada uma segunda transformada de *Fourier*, realizada pelo computador, que gera o espectro obtido,  $S(\lambda)$ .

Dependendo da região do espectro de infravermelhos que se pretende alcançar, são utilizados diferentes tipos de detetores, fontes de luz e outros componentes óticos.

## 1.2. Técnicas de Medições

Na técnica de FTIR, a leitura da amostra pode ser feita de duas formas, através de medições de transmissão e através da reflectância total atenuada (ATR).

Nas medidas de transmissão, a luz infravermelha passa por uma cuvette, que contém a amostra que se pretende medir, antes de atingir o detetor. Quando a amostra é homogénea, a luz absorvida comporta-se segundo a lei de *Lambert-Beer*, equação 1,

**Equação 1:** Lei de *Lambert-Beer*.

$$A(\tilde{\nu}) = \log(I_0/I) = c\varepsilon(\tilde{\nu})d$$

onde  $A$  é a absorvância,  $I_0$  é a intensidade da luz antes de atingir a amostra,  $I$  é a intensidade da luz após passar a amostra,  $c$  é a concentração da amostra,  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar e  $d$  é o comprimento do percurso ótico.

As cuvettes utilizadas podem ser de seleneto de zinco, ZnSe, fluoreto de bário, BaF<sub>2</sub>, e fluoreto de cálcio, CaF<sub>2</sub>, sendo que as duas últimas têm a vantagem de poderem ser excitadas pela luz ultravioleta. Uma cuvette de infravermelho desmontável é constituída por duas janelas de plano, separadas por um espaçador que define o percurso ótico, ou uma janela de plano e uma janela com uma calha.<sup>94,133</sup>

Uma vantagem da técnica são as quantidades de amostra necessárias para a sua execução. Normalmente, em espectroscopia de infravermelhos, são usadas, para proteínas, concentrações na gama de 0,1mM a 1mM, e para pequenas moléculas, concentrações na gama de 1mM a 100mM. Contudo, já foram usadas concentrações de proteína de 0,3mg/ml num baixo volume de amostra, tipicamente entre 10µg a 100µg podendo ir até 50ng.<sup>94,134</sup>

A técnica de reflectância total atenuada evita os problemas de manipulação que são causados pelo curto comprimento de caminho necessário na técnica de transmissão.<sup>94</sup>

Na técnica de ATR, uma amostra é colocada num cristal com um índice de refração maior que o da amostra, tipicamente superior a 2. A luz infravermelha é acoplada ao cristal e direccionada para a interface da amostra, com um ângulo de incidência, e é totalmente refletida na interface entre amostra e o cristal. Após a reflexão na interface entre amostra e cristal, a luz penetra na amostra. Depois de várias reflexões, a luz de medição sai do cristal e é focada no detetor. A onda evanescente gerada tem a mesma frequência que a luz que entra no cristal contudo, a amplitude do campo elétrico decai exponencialmente com a distância da interface. A onda evanescente pode ser absorvida pela amostra e a luz que atinge o detetor é portadora da informação sobre o espectro infravermelho da amostra.<sup>94</sup>

A profundidade de introdução do feixe de luz no cristal, que depende do ângulo de incidência e da proporção dos índices de refração do cristal com a amostra, está na ordem do comprimento de onda, o que significa que a espessura ótica da amostra é pequena o suficiente para medições de soluções aquosas.<sup>94</sup>

No caso de amostras de proteínas, é preparada normalmente uma película de proteína na superfície do cristal e é colocado um tampão sobre o filme, onde a espessura da camada do tampão não influencia o espectro medido e onde o tampão pode ser trocado sem perturbar o filme. A desvantagem foca-se na preparação de um filme estável que pode ser difícil e às vezes impossível.<sup>94,134,135</sup>

### 1.3. Cálculo da banda de amida I

Para calcular a banda de amida I de uma proteína, existem diversas formas.

No caso de estruturas secundárias infinitas, a sua simetria reduz o número de vibrações observáveis e o efeito de acoplamento dipolar de transição (TDC) é facilmente calculado. Esta é uma abordagem simples que consegue explicar as características gerais de absorção da região de amida I de estruturas secundárias.<sup>99</sup>

No cálculo da banda de proteínas da amida I, foi desenvolvido um modelo de oscilador flutuante que considera os osciladores de amida I isolados. Os osciladores imperturbáveis vibram com uma frequência intrínseca,  $\nu_0$ .<sup>136</sup> Ao ajustar a frequência que não é perturbada, os efeitos das ligações de hidrogénio, a não planaridade do grupo de peptídeos assim como as interações entre ligações podem ser contabilizadas. Nestes cálculos da região de amida I, as alterações de frequência intrínseca e as constantes de força de interação entre os vizinhos mais próximos na sequência, são retiradas dos cálculos funcionais de densidade, e todas as outras interações são calculadas a partir de TDC e modelos de ligação de hidrogénio.<sup>94</sup>

Uma outra análise pode ser realizada através da utilização de um campo de força de valência geral simplificado para o polipéptido com o de N-metilacetamida que serve como ponto de partida.<sup>137</sup> O campo de força é, deste modo, refinado para uma estrutura de polipéptido dada de modo a combinar as frequências calculadas com a experiência realizada.<sup>137</sup> As ligações de hidrogénio podem ser incluídas no campo de força, atribuindo constantes de força ao alongamento H-O e às vibrações de flexão N-H-O e C-O-H.<sup>137</sup> Em contraste com o modelo de oscilador flutuante para a vibração da amida I, os cálculos efetuados fornecem todas as frequências vibracionais do polipéptido e é possível reproduzir os espectros vibracionais observados de polipéptidos regulares, com um erro médio de  $5\text{cm}^{-1}$ . Recentemente, sugeriu-se que o momento do dipolo de transição de um determinado grupo amida depende das coordenadas de outros grupos.<sup>138</sup>

No caso de peptídeos pequenos que apresentam uma estrutura definida, são realizados cálculos funcionais de densidade que incluem acoplamento de dipolo de transição, acoplamento de ligação e os efeitos de ligações de hidrogénio.<sup>138,139</sup>



## 2. Eletroforese em Géis de Poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida é normalmente utilizada em bioquímica, forense, genética, biologia molecular e biotecnologia para separar, normalmente, proteínas ou ácidos nucleicos.<sup>140,141</sup> Esta técnica de separação baseia-se na separação de moléculas através da migração das suas partículas, num gel adequado à amostra em estudo, durante a aplicação de uma diferença de potencial. Estas moléculas são separadas de acordo com o seu peso molecular, onde as moléculas de menor peso molecular vão migrar mais rapidamente do que as moléculas com pesos moleculares superiores.<sup>141–143</sup>

A poliacrilamida é uma mistura de acrilamida e bisacrilamida. Com a mistura destes dois polímeros há a formação de uma rede onde a razão de concentração entre as diferentes moléculas permite a criação de diferentes gradientes de separação.<sup>114,140–143</sup>

Para que a migração das moléculas ao longo do gel ocorra é necessário fazer reagir a amostra com o detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS, que apresenta uma carga negativa, ao ligar-se às moléculas das proteínas, supera a carga intrínseca destas, e faz com que a proteína migre em direção ao eletrodo positivo quando a tensão é aplicada.<sup>114,142,143</sup>

As proteínas que apresentam um peso molecular semelhante migram através do gel praticamente à mesma velocidade uma vez que o SDS liga o mesmo número de moléculas a proteínas com o mesmo peso molecular.<sup>114,142,143</sup> Deste modo apresentam uma carga global negativa de valor equivalente migrando pelo gel à mesma velocidade. Quando apresentam um peso molecular diferente, as proteínas maiores, que apresentam uma carga negativa igualmente superior, são submetidas a forças elétricas maiores e também a um retardamento maior.<sup>114,140–143</sup> Este tipo de separação é possível devido às malhas do gel de poliacrilamida onde as proteínas de pesos moleculares superiores ficam presas nas malhas do gel, retardando a sua migração e permitindo assim a separação consoante o peso molecular das proteínas.<sup>114,140–143</sup> Deste modo as proteínas aparecem separadas em bandas, que correspondem ao seu peso molecular, e aparecem orientadas no gel consoante o seu tamanho e tornando-se visíveis após a adição de azul de Coomassie.<sup>114,140–143</sup>

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

**Tabela 0.1:** Reagentes e respetiva quantidade para a realização de dois géis de poliacrilamida.

Reagentes	Gel de resolução 12%	Gel de separação 5%
Água ultrapura	3,3 mL	2,1 mL
Mix de Acrilamida 30% ( <i>Bio-Rad</i> )	4,0 mL	0,5 mL
Tampão de resolução, pH 8.8 (tabela 2)	2,5 mL	---
Tampão de separação, pH 6.8 (tabela 2)	---	0,38 mL
Dodecil Sulfato de Sódio 10% (SDS, <i>Panreac</i> )	0,1 mL	0,03 mL
Persulfato de Amónia 10% (APS, <i>Sigma Aldrich</i> , ≥98%)	0,1 mL	0,03 mL
Tetrametiletenodiamina (TEMED, <i>Bio Rad</i> )	0,004 mL	0,003 mL

**Tabela 0.2:** Lista de soluções e respetiva receita utilizadas na eletroforese de poliacrilamida em SDS.

Soluções	Receita
<b>Tampão de resolução</b>	18,17g de Tris Base 1,5M ( <i>Carlo Erba reagentes</i> ) Ácido clorídrico até pH=8,8 ( <i>Scharlau, 36,5-38%</i> ) 4 mL de SDS 10% ( <i>Panreac</i> ) H <sub>2</sub> O ultra pura até perfazer 100 mL
<b>Tampão de separação</b>	6,06g de Tris Base 0,5M ( <i>Carlo Erba reagentes</i> ) Ácido clorídrico até pH=6.8 ( <i>Scharlau, 36.5-38%</i> ) 4 mL de SDS 10% ( <i>Panreac</i> ) H <sub>2</sub> O ultra pura até perfazer 100 mL
<b>SDS 10%</b>	10g de SDS ( <i>Panreac</i> ) 100 mL de H <sub>2</sub> O ultra pura
<b>APS 10%</b>	10 mg de APS ( <i>Sigma Aldrich, ≥98%</i> ) 10 mL de H <sub>2</sub> O ultra pura
<b>Tampão de corrida 10x</b>	144,1g de Glicina 1,92M ( <i>Sigma Aldrich, ≥99%</i> ) 30,3g de Tris Base 0,25M ( <i>Carlo Erba reagentes</i> ) 10g de SDS ( <i>Panreac</i> )
<b>Tampão de amostra</b>	2 mL de Glicerol ( <i>Panreac, 87%</i> ) 1 mL de β-mercaptoetanol ( <i>Sigma Aldrich, ≥99%</i> ) 5 mL de SDS 10% ( <i>Panreac</i> ) 2.5 mL de Tampão de separação 2 mg de Azul de Bromofenol ( <i>Panreac</i> )
<b>Solução corante</b>	1 g de Azul de Coomassie R-250 ( <i>Sigma Aldrich</i> ) 15 mL de Ácido acético ( <i>Carlo Erba reagentes</i> ) 90 mL de Metanol ( <i>Sigma Aldrich, ≥99,8%</i> ) H <sub>2</sub> O ultra pura até perfazer 200 mL
<b>Solução descorante</b>	75 mL de Ácido acético <i>Carlo Erba reagentes</i> ) 450 mL de Metanol ( <i>Sigma Aldrich, ≥99,8%</i> ) H <sub>2</sub> O ultra pura até perfazer 1000 mL

### 3.2. Proteólise

**Tabela 0.3:**Lista de soluções utilizadas na metodologia adaptada de Kuchroo e Fox.

Soluções	Receita
<b>Solução indicadora</b>	Juntar a solução indicadora de vermelho de metilo e a solução indicadora de azul de metilo, conservar num frasco escuro e a 4°C
<b>Solução indicadora de vermelho de metilo</b>	0,2g de vermelho de metilo ( <i>MERCK</i> ) Perfazer com álcool etílico a 95°C até 100mL
<b>Solução indicadora de azul de metilo</b>	0,1g de azul de metilo ( <i>HIMEDIA</i> ) Perfazer com álcool etílico a 95°C até 50mL
<b>Mistura catalisadora</b>	100g de sulfato de potássio ( <i>Chem-Lab</i> , ≥99%) 1g de selénio negro ( <i>ACROS ORGANIC</i> , ≥99%)
<b>Solução PTA 33,3% (m/v), para 50mL</b>	16,5g de PTA ( <i>Acros Organic</i> , 82%) 50mL de H <sub>2</sub> O ultra pura
<b>Solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3,95M</b>	Num balão de 100mL: 25mL de H <sub>2</sub> O <sub>UP</sub> 22mL H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 18M ( <i>Chem-Lab</i> , 95-97%) Perfazer com H <sub>2</sub> O <sub>UP</sub>
<b>Solução TCA 24% (m/v), para 100mL</b>	24g de TCA ( <i>PanReac AppliChem</i> ) 50mL de H <sub>2</sub> O <sub>UP</sub>

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. $\beta$ -lactoglobulina

#### 4.1.1. Estudo das diferentes condições de pré-tratamento

##### 4.1.1.1. Espectro de FTIR: Região de Amida I

**Tabela 0.4:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH.

Estrutura Secundária	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1623	14,66
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1632	20,40
<i>Random Coil</i>	1640	20,43
Hélices- $\alpha$	1650	24,44
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1663	14,98
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1675	5,08

**Tabela 0.5:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH.

Estrutura Secundária	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	6,21
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1626	11,08
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1633	18,38
<i>Random Coil</i>	1641	18,39
Hélices- $\alpha$	1650	23,60
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1663	16,94
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1676	5,39

**Tabela 0.6:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH.

Estrutura Secundária	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,13
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1629	19,75
<i>Random Coil</i>	1640	30,08
Hélices- $\alpha$	1653	29,99
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1668	11,04

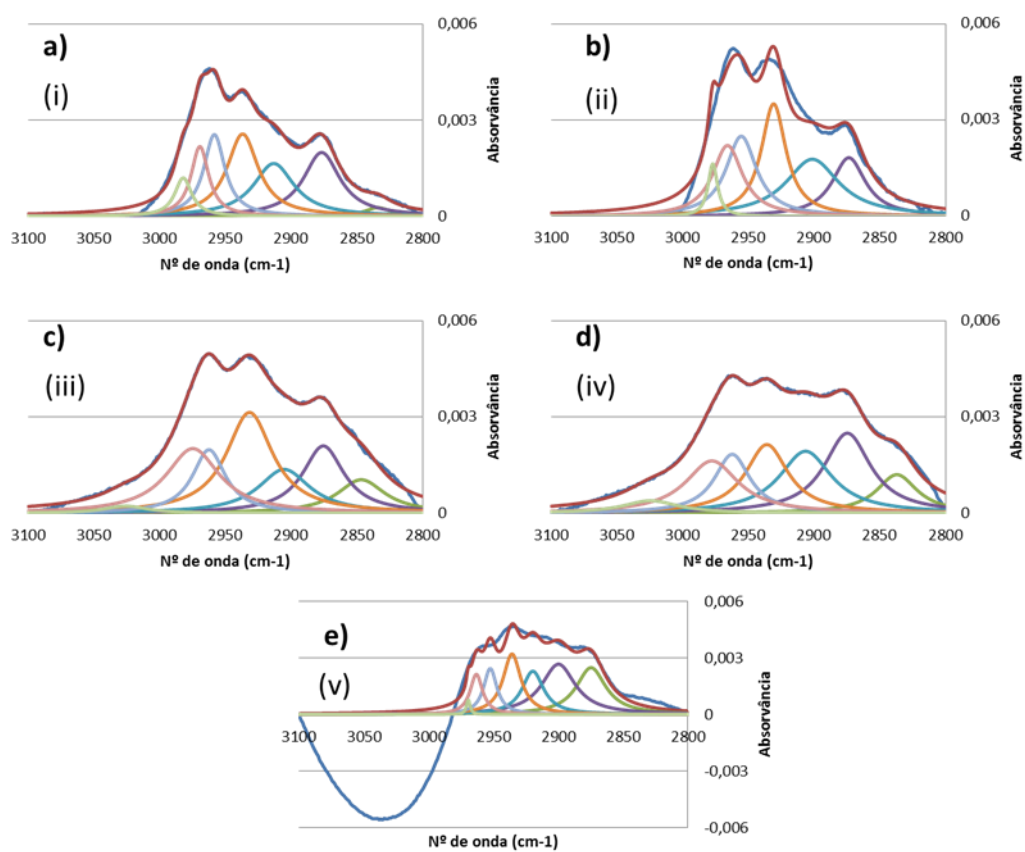
**Tabela 0.7:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,21
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1629	20,70
<i>Random Coil</i>	1641	20,27
Hélices- $\alpha$	1653	29,58
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1669	10,23

**Tabela 0.8:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1617	8,89
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1628	18,68
<i>Random Coil</i>	1641	29,32
Hélices- $\alpha$	1656	29,99
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1674	13,12

#### 4.1.1.2. Espectro de FTIR: Região de Amida A e B



**Figura 2:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, desconvoluído, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% nas cinco condições de pré-tratamento. **a)** Sem aquecimento sem acerto de pH (i). **b)** Sem aquecimento com acerto de pH (ii). **c)** Com aquecimento sem acerto de pH (iii). **d)** Com aquecimento seguido do acerto de pH (iv). **e)** Com acerto de pH seguido de aquecimento (v).

**Tabela 0.9:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2834	2,12
2877	21,44
2913	19,73
2937	23,65
2958	15,79
2969	11,28
2982	5,00

**Tabela 0.10:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2800	0,011
2874	15,15
2901	23,65
2930	21,67
2955	19,07
2966	16,58
2977	3,87

**Tabela 0.11:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2860	9,29
2883	16,21
2910	13,20
2933	27,22
2962	12,13
2972	20,17
3018	1,78

**Tabela 0.12:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2850	9,22
2883	21,87
2912	19,18
2937	17,14
2961	12,32
2975	16,26
3015	4,02

**Tabela 0.13:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2880	22,12
2903	27,04
2921	14,94
2936	17,30
2952	9,75
2963	8,00
2969	0,83



#### 4.1.2. Otimização da concentração de transglutaminase para reticulação nas melhores condições de pré-tratamento

##### 4.1.2.1. Espectro de FTIR: Região de Amida I

##### 4.1.2.1.1. Condição de pré-tratamento: com aquecimento seguido do acerto de pH

**Tabela 0.14:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 25U de TG/g de proteína.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,84
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1629	19,66
<i>Random Coil</i>	1640	28
Hélices- $\alpha$	1652	29,58
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1667	12,92

**Tabela 0.15:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 50U de TG/g de proteína.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1623	16,16
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1635	32,54
<i>Random Coil</i>	1648	32,92
Hélices- $\alpha$	1662	14,69
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1676	3,68

**Tabela 0.16:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 100U de TG/g de proteína.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1625	28,72
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1637	35,36
<i>Random Coil</i>	1650	22,96
Hélices- $\alpha$	1664	9,89
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1677	3,06

**Tabela 0.17:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 200U de TG/g de proteína.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,07
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1629	19,46
<i>Random Coil</i>	1639	27,88
Hélices- $\alpha$	1652	30,02
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1667	13,57

#### 4.1.2.1.2. Condição de pré-tratamento: com acerto de pH seguido de aquecimento

**Tabela 0.18:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 25U de TG/g de proteína.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,75
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1629	18,56
<i>Random Coil</i>	1640	26,84
Hélices- $\alpha$	1652	30,37
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1667	14,48

**Tabela 0.19:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 50U de TG/g de proteína.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,55
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1629	20,61
<i>Random Coil</i>	1640	28,63
Hélices- $\alpha$	1652	29,07
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1667	12,15

**Tabela 0.20:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 100U de TG/g de proteína.

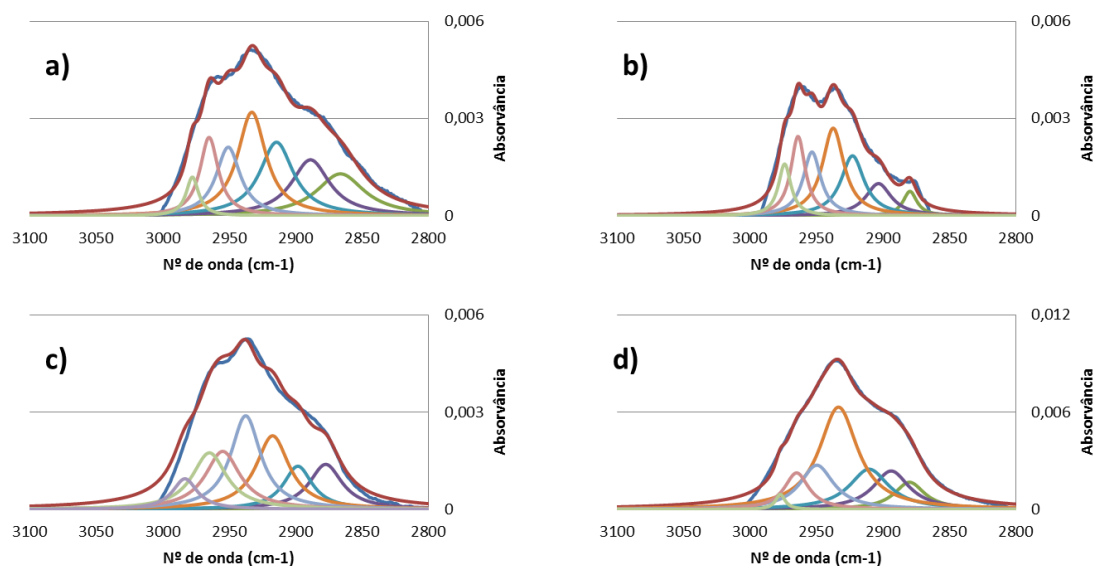
Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,66
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1630	22,83
<i>Random Coil</i>	1641	29,28
Hélices- $\alpha$	1654	27,55
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1669	10,68

**Tabela 0.21:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 200U de TG/g de proteína.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,4
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1628	17,79
<i>Random Coil</i>	1639	27,34
Hélices- $\alpha$	1651	31,04
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1666	14,42

#### 4.1.2.2. Espectro de FTIR: Região de Amida A e B

##### 4.1.2.2.1. Condição de pré-tratamento: com aquecimento seguido do acerto de pH



**Figura 3:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, desconvoluido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH (iv). **a)** Com 25U de TG/g de proteína. **b)** Com 50U de TG/g de proteína. **c)** Com 100U de TG/g de proteína. **d)** Com 200U de TG/g de proteína.

**Tabela 0.22:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 25U de TG/g de proteína.

Número de onda (cm-1)	Área analítica (%)
2876	15,40
2894	16,23
2917	18,79
2934	22,28
2950	12,65
2964	10,95
2977	3,70

**Tabela 0.23:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 50U de TG/g de proteína.

Número de onda (cm-1)	Área analítica (%)
2882	5,32
2906	12,91
2924	21,76
2938	29,47
2953	17,66
2963	17,87
2973	10,17

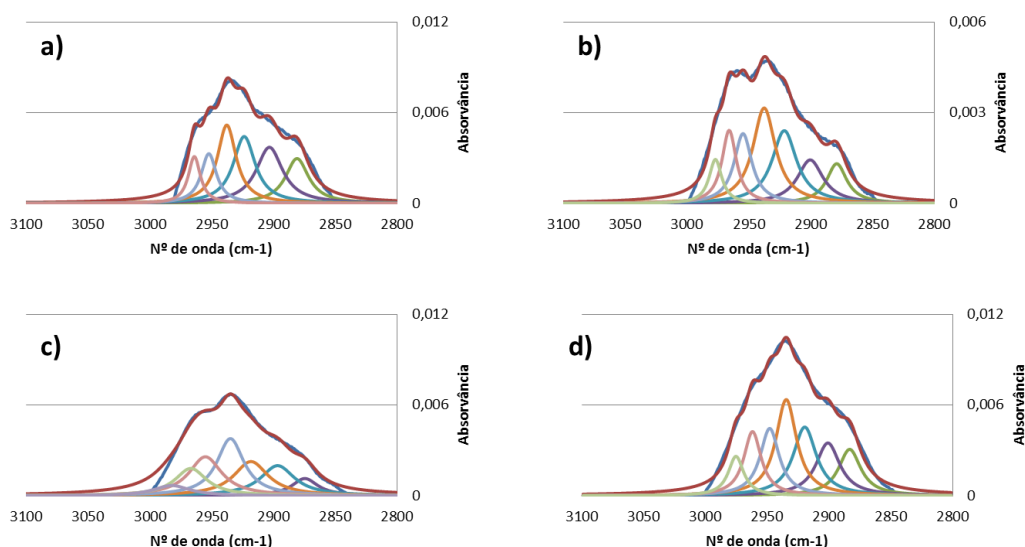
**Tabela 0.24:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 100U de TG/g de proteína.

Número de onda (cm-1)	Área analítica (%)
2866	0,03
2883	11,69
2901	9,79
2919	19,27
2938	22,01
2954	15,90
2964	15,34
2981	5,97

**Tabela 0.25:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH na presença de 200U de TG/g de proteína.

Número de onda (cm-1)	Área analítica (%)
2885	8,01
2898	13,48
2914	15,49
2935	38,29
2950	14,49
2964	8,78
2977	1,42

#### 4.1.2.2.2. Condição de pré-tratamento: com acerto de pH seguido de aquecimento



**Figura 4:** Espectros, obtidos pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, desconvoluído, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento com acerto de pH seguido de aquecimento (v). **a)** Com 25U de TG/g de proteína. **b)** Com 50U de TG/g de proteína. **c)** Com 100U de TG/g de proteína. **d)** Com 200U de TG/g de proteína.

**Tabela 0.26:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 25U de TG/g de proteína.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2885	15,30
2906	21,84
2925	21,68
2938	21,62
2952	11,23
2963	8,33

**Tabela 0.27:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 50U de TG/g de proteína.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2882	9,17
2903	12,86
2923	20,54
2938	24,68
2954	14,21
2965	12,07
2976	6,45

**Tabela 0.28:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 100U de TG/g de proteína.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2806	7,01e-5
2879	6,69
2901	15,29
2920	17,53
2936	22,99
2955	19,02
2966	12,91
2979	5,55

**Tabela 0.29:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de  $\beta$ -lactoglobulina a 5% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento na presença de 200U de TG/g de proteína.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2887	11,62
2904	14,22
2921	17,94
2935	22,37
2948	14,45
2961	12,54
2974	6,87

### 4.1.3. Estudo da cinética com transglutaminase em condições otimizadas de concentração e de enzima

#### 4.1.3.1. Condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de TG/g de $\beta$ -lactoglobulina

**Tabela 0.30:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

	0h		2h		4h		6h		8h		10h	
<b>Estrutura Secundária</b>	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1618	7,97	1619	9,08	1619	9,63	1618	8,12	1619	9,63	1622	13,76
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1628	16,57	1628	18,24	1629	19,49	1628	17,91	1629	19,56	1634	32,11
<i>Random Coil</i>	1638	26,55	1639	27,5	1639	27,96	1638	27,13	1639	27,94	1647	34,83
Hélices- $\alpha$	1650	32,15	1651	30,58	1652	29,88	1650	31,05	1652	29,69	1661	15,67
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1665	16,76	1665	14,61	1667	13,03	1665	15,79	1667	13,19	1679	3,63



#### 4.1.3.2. Condição de pré-tratamento com aquecimento seguido de acerto de pH com 25U de TG/g de $\beta$ -lactoglobulina

**Tabela 0.31:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação da  $\beta$ -lactoglobulina a 5% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	0h		30min		1h		1:30h		2h		2:30h		3h		4h	
	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1619	9,45	1618	8,73	1619	9,25	1621	13,23	1619	10,25	1619	9,57	1618	8,4	1619	9,32
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1628	17,67	1628	17,94	1629	19,3	1632	29,19	1630	22,39	1629	20,17	1628	20,28	1630	24,06
<i>Random Coil</i>	1638	26,82	1638	27,9	1639	28	1645	31,37	1641	30,75	1640	29,12	1639	29,08	1642	31,95
Hélices- $\alpha$	1651	31,27	1651	31,36	1652	30,25	1658	20,2	1654	27,78	1653	29,66	1652	29,7	1655	26,11
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1666	14,5	1666	14,07	1667	13,2	1673	6,02	1670	8,82	1668	11,49	1667	12,54	1670	8,5

## 4.2. Soro comercial

### 4.2.1. Otimização das condições de pré-tratamento

#### 4.2.1.1. Espectro de FTIR: Região de Amida I

**Tabela 0.32:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1627	6,62
Folhas-β Intramoleculares	1637	24,78
Hélices-α	1649	54,82
Folhas-β Intermoleculares	1661	10,34
Folhas-β Intramoleculares	1671	3,84

**Tabela 0.33:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1626	7,04
Folhas-β Intramoleculares	1637	29,92
Hélices-α	1649	41,79
Folhas-β Intermoleculares	1660	17,67
Folhas-β Intramoleculares	1672	3,58

**Tabela 0.34:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1622	10,57
Folhas-β Intramoleculares	1631	17,98
Hélices-α	1641	26,36
Folhas-β Intermoleculares	1653	27,82
Folhas-β Intramoleculares	1667	17,27

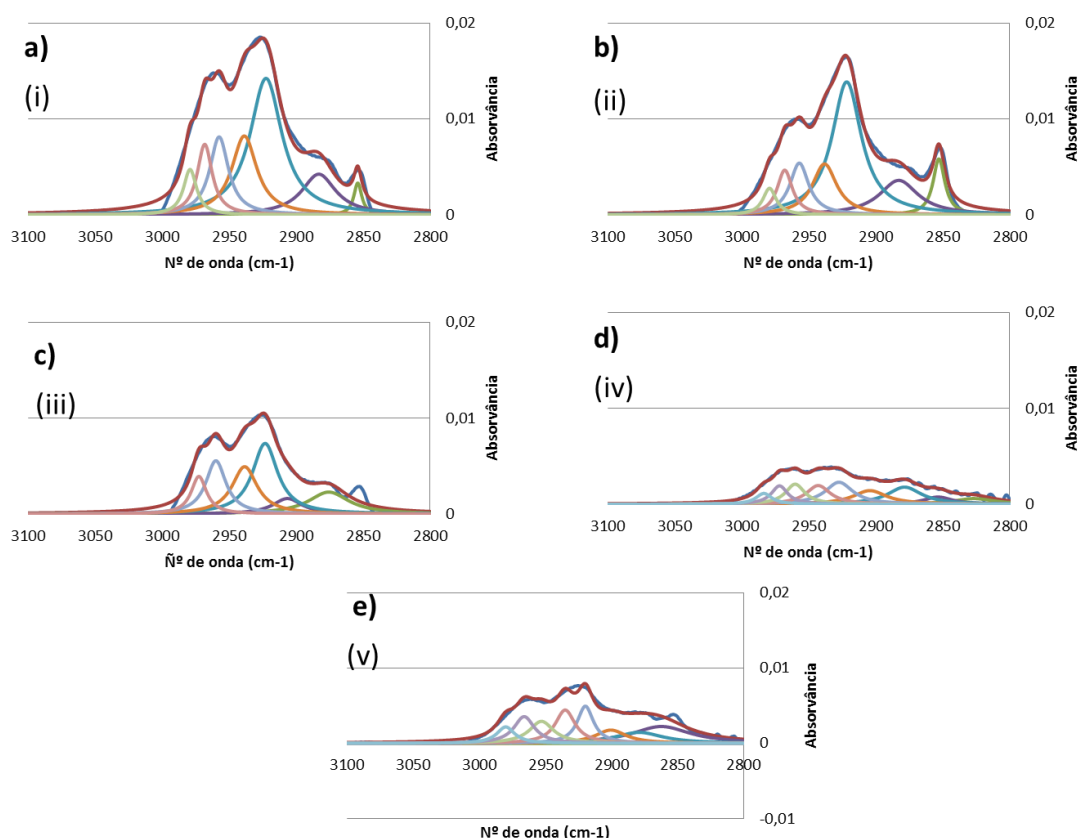
**Tabela 0.35:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1626	7,58
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1636	21,78
Hélices- $\alpha$	1648	48,23
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1657	3,97
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1665	18,44

**Tabela 0.36:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1627	16,1
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1638	25,02
Hélices- $\alpha$	1648	26,09
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1659	20,31
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1671	12,48

#### 4.2.1.2. Espectro de FTIR: Região de Amida A e B



**Figura 5:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na região da banda de amida A e B, desconvoluído, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro comercial a 9% nas cinco condições de pré-tratamento. **a)** Sem aquecimento sem acerto de pH (i). **b)** Sem aquecimento com acerto de pH (ii). **c)** Com aquecimento sem acerto de pH (iii). **d)** Com aquecimento seguido do acerto de pH (iv). **e)** Com acerto de pH seguido de aquecimento (v).

**Tabela 0.37:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH.

Número de onda (cm-1)	Área analítica (%)
2854	2,29
2883	12,53
2922	39,33
2939	17,84
2957	13,12
2968	9,52
2979	5,37

**Tabela 0.38:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2853	7,19
2883	14,62
2922	42,65
2938	13,55
2957	10,63
2968	7,47
2979	3,88

**Tabela 0.39:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2876	10,29
2906	5,23
2923	20,39
2938	13,69
2960	12,26
2972	6,66

**Tabela 0.40:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

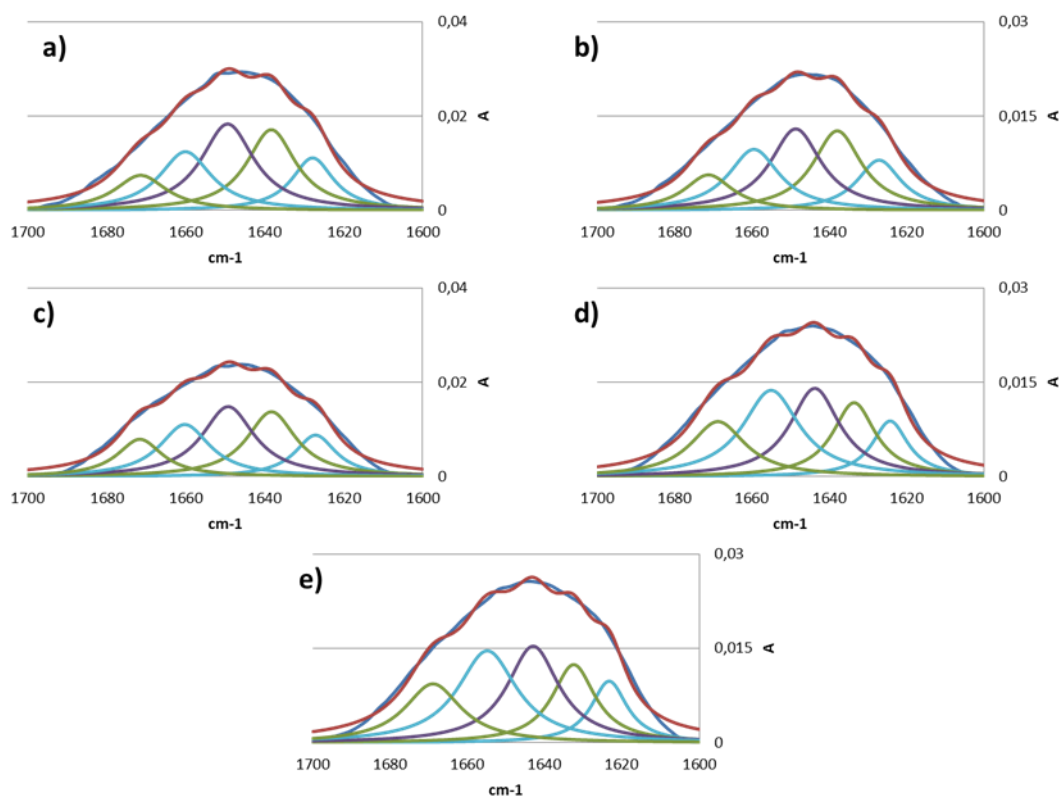
Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2842	17,01
2860	15,26
2884	42,65
2908	33,81
2929	44,69
2943	33,02
2960	28,25
2971	22,02
2982	12,72

**Tabela 0.41:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
2800	0,03
2862	20,37
2879	10,86
2900	8,48
2920	12,36
2935	13,54
2953	11,05
2966	11,30
2980	6,06

#### 4.2.2. Estudo da adição de 50U de transglutaminase/g de proteína nas diferentes condições de pré-tratamento

##### 4.2.2.1. Espectro de FTIR: Região de Amida I



**Figura 6:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na banda de amida I, desconvolvido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro comercial em D2O a 9% com 50U de TG/g de proteína nas cinco condições de pré-tratamento. **a)** Sem aquecimento sem acerto de pH (i). **b)** Sem aquecimento com acerto de pH (ii). **c)** Com aquecimento sem acerto de pH (iii). **d)** Com aquecimento seguido do acerto de pH (iv). **e)** Com acerto de pH seguido de aquecimento (v). **Legenda:** a azul-escuro é o espectro observado; a vermelho é o espectro desconvolvido; a azul ciano encontram-se as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intermoleculares; a verde as bandas correspondentes às folhas- $\beta$  intramoleculares; a roxo a banda correspondente às hélices- $\alpha$ .

**Tabela 0.42:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1630	14,11
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1640	25,33
Hélices- $\alpha$	1649	29,31
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1659	19,53
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1669	11,72

**Tabela 0.43:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (ii) sem aquecimento com acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1629	14,7
Folhas-β Intramoleculares	1639	25,66
Hélices-α	1649	27,58
Folhas-β Intermoleculares	1658	20,65
Folhas-β Intramoleculares	1669	11,41

**Tabela 0.44:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iii) com aquecimento sem acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1629	13,2
Folhas-β Intramoleculares	1639	24,83
Hélices-α	1649	28,42
Folhas-β Intermoleculares	1659	10,42
Folhas-β Intramoleculares	1669	13,13

**Tabela 0.45:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1626	11,46
Folhas-β Intramoleculares	1635	18,07
Hélices-α	1644	25,15
Folhas-β Intermoleculares	1654	28,04
Folhas-β Intramoleculares	1666	17,28

**Tabela 0.46:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1626	11,46
Folhas-β Intramoleculares	1634	17,42
Hélices-α	1644	25,85
Folhas-β Intermoleculares	1654	28,06
Folhas-β Intramoleculares	1666	17,2

### 4.2.3. Estudo da cinética de reticulação com transglutaminase em condições de pré-tratamento otimizada

#### 4.2.3.1. Cinética da condição com acerto de pH seguido de aquecimento com 50U de transglutaminase/g de proteína, 24h

**Tabela 0.47:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro comercial a 9% com 50U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (v) com acerto de pH seguido de aquecimento.

	0h		1h		2h		3h		4h		5h		8h		10h		12h		18h		24h		
Estrutura Secundária	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Estrutura Secundária	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1925	11,15	1625	11,56	1626	11,22	1626	10,87	1626	11,14	1627	11,27	1628	12,38	1627	11,2	1628	10,89	1629	11,58	1623	7,23	
Folhas-β Intramoleculares	1633	17,41	1634	17,45	1634	17,38	1635	17,13	1635	17,15	1636	17,87	1638	21,29	1636	18,28	1639	24,41	1639	24,63	1631	14,82	
Hélices-α	1643	24,76	1643	24,85	1644	25,26	1644	23,21	1644	23,01	1645	23,19	1647	26,13	1645	22,74	1649	32,22	1649	31,48	1641	22,94	
Folhas-β Intermoleculares	1653	28,43	1653	28,22	1654	28,29	1653	28,89	1653	28,84	1654	28,5	1657	24,34	1654	27,55	1659	20,29	1660	20,26	1651	30,95	
Folhas-	16	18,	16	17,	16	17,	16	19,	16	19,	16	19,	16	15,	166	20,	1669	12,	167	12,	166	24,	



β Intramolecular s	65	25	66	91	66	84	66	9	66	86	66	17	68	86	6	23		19	0	05	4	07
--------------------------	----	----	----	----	----	----	----	---	----	----	----	----	----	----	---	----	--	----	---	----	---	----

#### 4.2.3.2. Cinética da condição com aquecimento seguido de acerto de pH com 100U de transglutaminase/g de proteína, 10h

**Tabela 0.48:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro comercial a 9% com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

Estrutura Secundária	0h		2h		4h		6h		8h		10h	
	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1629	18,07	1629	18,63	1628	16,41	1629	18,06	1629	20,75	1629	19,09
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1638	22,31	1639	23,06	1638	22,33	1639	24,26	1640	25,86	1639	23,94
Hélices- $\alpha$	1647	24,19	1648	23,84	1647	26,94	1648	25,26	1648	22,78	1648	25,44
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1657	22,04	1658	20,8	1657	21,69	1658	20,11	1658	19,22	1658	19,83
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1668	13,38	1668	13,67	1668	12,63	1668	12,3	1668	12,4	1668	11,7

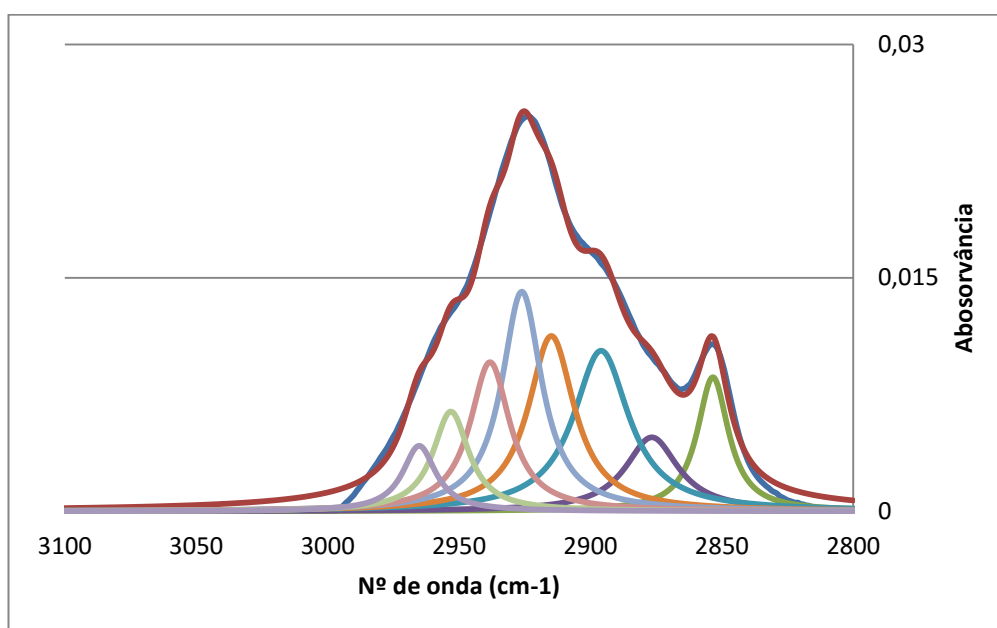
### 4.3. Soro de queijo

#### 4.3.1. Espectro de FTIR: Região de Amida I

**Tabela 0.49:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH.

Estrutura Secundária	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas-β Intermoleculares	1631	10,6
Folhas-β Intramoleculares	1638	18,54
Hélices-α	1645	22,56
Folhas-β Intermoleculares	1653	33,21
Folhas-β Intramoleculares	1661	15,1

#### 4.3.2. Espectro de FTIR: Região de Amida A e B



**Figura 7:** Espectro, obtido pela espectroscopia de FTIR na banda de amida A e B, desconvolvido, através do programa *PeakFit v4.12*, da amostra de soro de queijo na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH. **Legenda:** a azul-escura é o espectro observado e a vermelho é o espectro desconvolvido.

**Tabela 0.50:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida A e B, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas da amostra de soro de queijo na condição de pré-tratamento (i) sem aquecimento sem acerto de pH.

Número de onda (cm-1)	Área analítica (%)
2800	0,03
2862	20,37
2879	10,86
2900	8,48
2920	12,36
2935	13,54
2953	11,05
2966	11,30
2980	6,06

#### 4.3.3. Estudo da cinética de reticulação com transglutaminase em condições de pré-tratamento otimizada: com aquecimento seguido do acerto de pH com 100U de transglutaminase/g de proteína, 10h

**Tabela 0.51:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa PeakFit v4.12, correspondentes às estruturas secundárias das amostras do estudo cinético da reticulação do soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido de acerto de pH.

	0h		2h		4h		6h		8h		10h	
<b>Estrutura Secundária</b>	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)	Nº de onda (cm-1)	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1631	16,58	1629	12,28	1629	13,22	1627	9,97	1629	13,36	1628	12,37
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1641	33,94	1638	27,96	1638	27,46	1635	17,84	1638	29,85	1638	28,94
Hélices- $\alpha$	1651	32,64	1648	33,5	1647	27,67	1642	21,17	1649	33,9	1648	34,29
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1659	11,46	1657	18,06	1655	20,67	1651	27,91	1658	15,6	1658	16,6
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1666	5,38	1666	8,2	1664	10,97	1661	23,11	1666	7,29	1667	7,8

#### 4.3.4. Estudo da adição de potenciadores e inibidores de transglutaminase na melhor condição de pré-tratamento de soro de queijo

##### 4.3.4.1. Potenciadores da transglutaminase

**Tabela 0.52:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH na presença de potenciadores da TG, sulfato de cálcio e sulfato de zinco.

Estrutura Secundária	Sulfato de Cálcio		Sulfato de Zinco	
	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1622	10,99	1622	11,7
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1630	18,11	1630	18,04
Hélices- $\alpha$	1640	27,04	1639	28,11
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1650	28,72	1650	28,52
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1664	15,15	1662	13,62

##### 4.3.4.2. Inibidores da transglutaminase

**Tabela 0.53:** Percentagens das áreas analíticas das bandas obtidas da desconvolução da banda de Amida I, através do programa *PeakFit v4.12*, correspondentes às estruturas secundárias das amostras de soro de queijo com 100U de TG/g de proteína na condição de pré-tratamento (iv) com aquecimento seguido do acerto de pH na presença de inibidores da TG, sulfato de cobre e sulfato de ferro.

Estrutura Secundária	Sulfato de Cobre		Sulfato de Ferro	
	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)	Nº de onda (cm <sup>-1</sup> )	Área analítica (%)
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1625	17,35	1621	15,14
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1637	30,19	1629	18,79
Hélices- $\alpha$	1648	31,34	1639	26,66
Folhas- $\beta$ Intermoleculares	1658	14,47	1650	25,71
Folhas- $\beta$ Intramoleculares	1666	6,65	1661	13,7